



CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS
DA USC (CIEDUS)

TESE DE DOUTORAMENTO

**EFECTO COMPARATIVO DE LA EFICACIA DE LA
TEMPERATURA AMBIENTAL Y LA LEPTINA EN
EL MODELO SIH E IMPLICACIÓN DE AMPK EN
LAS CONSECUENCIAS DEL MODELO ABA Y SU
REVERSIÓN CON CALOR**

Ángela Fraga Varela

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE NEUROCIENCIA E PSICOLOXÍA CLÍNICA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANO 2019





DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

Efecto comparativo de la eficacia de la temperatura ambiental y la leptina en el modelo SIH e implicación de AMPK en las consecuencias del modelo ABA y su reversión con calor

D./Dña. Ángela Fraga Varela

Efecto comparativo de la eficacia de la temperatura ambiental y la leptina en el modelo SIH e implicación de AMPK en las consecuencias del modelo ABA y su reversión con calor
Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) *La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) *En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) *La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) *Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Santiago de Compostela, Abril de 2019

Fdo.





AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR / TITOR DA TESE

Efecto comparativo de la eficacia de la temperatura ambiental y la leptina en el modelo SIH e implicación de AMPK en las consecuencias del modelo ABA y su reversión con calor

D. Emilio Gutiérrez García
D. Miguel López Pérez

INFORMA/N:

*Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D/Dna. **Ángela Fraga Varela**, baixo a miña dirección, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.*

En Santiago de Compostela, Abril de 2019

Asdo. Emilio Gutiérrez
García

Asdo. Miguel López
Pérez





A mis padres

A mi hermana



RESUMEN

La hipótesis que vincula la hiperactividad con la pérdida de peso asociada a la hipoleptinemia en la anorexia nerviosa cobró impulso a partir de un estudio en el que la leptina suprimió la hiperactividad inducida por semi-inanición en ratas. Alternativamente, la temperatura ambiente es un factor clave en la modulación de la actividad en ratas sometidas a restricción de alimento. En la presente Tesis Doctoral se estudió el efecto comparativo del calor y la administración de leptina en la prevención de la hiperactividad en el modelo SIH. Se demostró que el calor previno la hiperactividad, la pérdida de peso y la hipotermia de los animales, mientras que la leptina no presentó ninguna diferencia en estas variables. Por otro lado, se estudió la posible implicación del sensor energético AMPK como mecanismo de acción por el que la temperatura ambiente produce sus efectos sobre las consecuencias a la exposición del modelo ABA, modulando el proceso de deterioro y de recuperación. Así, el calor produce una disminución de los marcadores termogénicos en el BAT lo que supone un ahorro energético que unido a la reducción de la actividad y al aumento de la ingesta permiten el aumento del peso corporal, lo cual ocurre independientemente de AMPK. Además, el calor revierte otras características metabólicas que presentan las ratas ABA como son la reducción de marcadores lipogénicos y lipolíticos, el aumento de marcadores de caquexia o la reducción y el aumento de los niveles de leptina y corticosterona en sangre, respectivamente. Estos resultados ponen de relieve que la temperatura ambiente desempeña un papel crítico en la regulación de la hiperactividad en ratas sometidas a restricción de alimento que puede ser relevante para el manejo de la misma en pacientes con anorexia nerviosa.

PALABRAS CLAVE: anorexia nerviosa, hiperactividad, modelo SIH, modelo ABA, AMPK.

RESUMO

A hipótese que vincula a hiperactividade coa perda de peso asociada á hipoleptinemia na anorexia nerviosa cobrou impulso dun estudo que demostrou que a leptina suprimiu a hiperactividade inducida por semi-inanición en ratas. Alternativamente, a temperatura ambiente é un factor crave na modulación da actividade en ratas sometidas a restricción de alimento. Na presente Tese Doutoral estudouse o efecto comparativo da calor e a administración de leptina na prevención da hiperactividade no modelo SIH. Demostrouse que a calor preveu a hiperactividade, a perda de peso e a hipotermia dos animais, mentres que a leptina non presentou ningunha diferenza nestas variables. Doutra banda, estudouse a posible implicación do sensor enerxético AMPK como mecanismo de acción polo que a temperatura ambiente produce os seus efectos sobre as consecuencias á exposición do modelo ABA, modulando o proceso de deterioro e de recuperación. Así, a calor produce unha diminución dos marcadores termoxénicos no BAT o que supón un aforro enerxético que unido á redución da actividade e ao aumento da inxesta permiten o aumento do peso corporal, o cal ocorre independentemente de AMPK. Ademais, a calor revirte outras características metabólicas que presentan as ratas ABA como son a redución de marcadores lipoxénicos e lipolíticos, o aumento de marcadores de caquexia ou a redución e o aumento dos niveis de leptina e corticosterona no sangue, respectivamente. Estes resultados poñen de relevo que a temperatura ambiente desempeña un papel crítico na regulación da hiperactividade en ratas sometidas a restricción de alimento que pode ser relevante para o manexo da mesma en pacientes con anorexia nerviosa.

PALABRAS CHAVE: anorexia nerviosa, hiperactividade, modelo SIH, modelo ABA, AMPK.

ABSTRACT

The hypothesis linking hyperactivity with weight loss associated with hypoleptinemia in anorexia nervosa gained momentum after a study showing that leptin suppressed semi-starvation induced hyperactivity in rats. Alternatively, ambient temperature is a key modulating factor of activity in rats exposed to food restriction. In this Doctoral Thesis, the comparative effect of heat and the leptin administration in the prevention of hyperactivity in the SIH model was studied. It was shown that heat prevented hyperactivity, weight loss and hypothermia, while leptin did not present any effect in these features. On the other hand, we studied the possible involvement of the AMPK, a cellular gauge, as a mechanism of action whereby the ambient temperature produces its effects on the ABA model consequences, modulating the deterioration process and recovery. Thus, the heat produces a decrease in BAT thermogenic markers, which means an energy saving that with the reduction of the activity and the increase of the intake together allow the increase of the corporal weight, which occurs independently of AMPK. In addition, the heat reverses other metabolic characteristics present in ABA rats such as the reduction of lipogenic and lipolytic markers, the increase in cachexia markers or the reduction and increase in leptin and corticosterone blood levels, respectively. These results highlight that ambient temperature plays a critical role in the regulation of hyperactivity in rats exposed to food restriction which may be relevant for the management of hyperactivity in patients with anorexia nervosa.

KEYWORDS: anorexia nervosa, hyperactivity, SIH model, ABA model, AMPK.



ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS





ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

ABA: Anorexia basada en la actividad, *Activity-based anorexia*.

AC: Activa.

ACC: Acetil-Coa carboxilasa, *acetyl-CoA carboxylase*.

AgRP: péptido relacionado con agutí, *agouti-related peptide*.

AL: Ad libitum.

AMPK: proteína quinasa activada por AMP, *AMP-activated protein kinase*.

ANOVA: análisis de la varianza.

APA: Asociación Americana de Psiquiatría, *American Psychiatric Association*.

ARC: núcleo arcuato, *arcuate nucleus*.

ATGL: lipasa adiposa de triglicéridos, *adipose triglyceride lipase*.

ATP: adenosín trifosfato.

ATROGINA-1: E3 ubiquitina ligasa, *E3 ubiquitin-protein ligase atrogin-1*.

BAT: Tejido adiposo marrón, *brown adipose tissue*.

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro, *brain-derived neurotrophic factor*.

BMI: índice de masa corporal, *body mass index*.

BMP8B: proteína morfogenética ósea 8B, *bone morphogenetic protein 8B*.

BSA: albumina de suero bovino, *albumin, from bovine serum*.

C/EBP: *CCAAT/enhancer-binding protein*.

CaMKK: calcio/calmodulina quinasa quinasa, *calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase*.

CART: transcrito regulado por cocaína y anfetamina, *cocaine- and amphetamine-regulated transcript*.

CB1: receptor canabinoide 1, *cannabinoid receptor 1*.

CHOP: proteína homóloga C / EBP, *homologous protein C / EBP*.

CIDEA: efector A inductor de muerte celular por fragmentación de DNA, *cell death-inducing DNA fragmentation factor- α -like effector A*.

CKK: colecistoquinina, *cholecystokinin*.

CNS: sistema nervioso central, *central nervous system*.

CPT1a: carnitina palmitoiltransferasa 1a, *carnitine palmitoyltransferase 1a*.

CRH: hormona liberadora de corticotropina, *corticotrophin-releasing hormone*.

DEPC: dietilpirocarbonato.

DMH: núcleo dorsomedial, *dorsomedial nucleus of hypothalamus*

DSM: manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, *diagnostic and statistical manual of mental disorders*.

ELISA: Enzimoimmunoensayo.

ER STRESS: estrés del retículo endoplasmático, *endoplasmatic reticulum stress*.

FADH: flavín adenín dinucleótido

FAS: ácido graso sintasa, *fatty acid synthase*.

FFAs: ácidos grasos libres, *free fatty acids*.

GRP78/BiP: proteína chaperona regulada por glucosa 78/proteína de unión a inmunoglobulina, *chaperone glucose regulated protein 78/binding immunoglobulin protein*.

HPA: Eje hipotalámico - hipofisis – adrenal.

HPG: Eje hipotalámico - hipofisis – gonadal.

HSL: lipasa sensible a hormonas, *hormone-sensitive lipase*.

ICV: Intracerebroventricular.

IO: oliva inferior, *inferior olive*

IL1: interleucina 1, *interleukine 1*.

IL6: interleucina 6, *interleukine 6*.

IN: Inactiva.

KSR2: quinasa supresora de Ras, *kinase suppressor of Ras*.

LEP: Leptina.

LEPR: receptor de leptina, *leptin receptors*.

LHA: núcleo lateral, *lateral hypothalamus*

LKB1: quinasa hepática B1, *liver kinasa B1*.

LPL: lipoproteína lipasa, *lipoprotein lipasa*.

Malonil-CoA: malonil-coenzima A

MANTRA: (*Maudsley model of anorexia treatment for adults*).

MC3R y MC4R: receptores de melanocortinas 3 y 4.

MCH: hormona concentradora de melanina, *melanin-concentrating hormone*.

MGL: lipasa monoacilglicerol.

mRNA: RNA mensajero.

mTOR: diana de rapamicina de mamífero, *mammalian target of rapamycin*.

MURF-1: E3 ubiquitina ligasa, *E3 ubiquitin-protein ligase Muscle Ring Finger-1*

NADH: dinucleótido de nicotinamida y adenina.

NPY: neuropeptido Y.

NTS: núcleo del tracto solitario, *nucleus of solitary tract*.

OMS: Organización Mundial de la Salud

OX: orexina, *orexin*.

PBS: tampón fosfato salino, *phosphate buffer saline*.

PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1, *phosphoenolpyruvate carboxykinase*.

PGC1 α : proteína 1 alpha coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas, *peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 alpha*.

PGC1 β : proteína 1 beta coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas, *peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 beta*.

PKA: proteína kinasa A.

POMC: proopiomelanocortina.

PP2C α : proteína fosfatasa 2C α , *protein phosphatase 2C alpha*.

PPAR γ : receptor activado por el proliferador del peroxisoma activado gamma, *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*.

PRDM16: *pr domain zinc finger16*.

PVH: núcleo paraventricular, *paraventricular hypothalamus*

RA: restricción de alimento.

RPa: rafe pálido, *raphe pallidus*.

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, *real time polymerase chain reaction*.

S6: proteína ribosomal S6, *ribosomal protein S6*.

S6K1: proteína ribosomal p70 S6 kinasa 1, *ribosomal protein S6 kinase beta-1*.

SDS-PAGE: gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

SEM: desviación estándar de la media, *standard error of the mean*.

SF1: factor esteroidogénico 1, *steroidogenic factor 1*.

SIH: hiperactividad inducida por semi-inanición, *Semistarvation induced Hyperactivity*.

SNC: sistema nervioso central, *central nervous system*.

SNS: sistema nervioso simpático, *sympathetic nervous system*.

SREBP: proteína de unión a elementos regulados por esterol, *sterol regulatory element-binding proteins*.

SSCM: (*Specialist supportive clinical management*).

T3: triyodotironina.

T4: tiroxina.

TA: Temperatura ambiente.

TC: Temperatura corporal.

TCC: terapia cognitiva conductual.

TNF α : factor de necrosis tumoral alfa, *tumor necrosis factor alpha*.

TRH: hormona liberadora de tirotrópina, *tyrotrophin-releasing hormone*.

UCP: Proteína desacopladora, *uncouplin protein 1*.

UPR: respuesta de proteínas mal plegadas, *unfolded protein response*.

VH: vehículo.

VMH: núcleo ventromedial, *ventromedial nucleus*.

VTA: área ventral tegmental, *ventral tegmental área*.

WAT: tejido adiposo blanco, *white adipose tissue*.

α -MSH: hormona estimuladora de melanocitos alfa, *alpha-Melanocyte-stimulating hormone*.

β 3-AR: receptor adrenérgico beta-3, *beta-3 adrenergic receptors*.

ANGLICISMOS

Browning: amarronamiento

Upstream: más arriba

ÍNDICE

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	11
CAPÍTULO PRIMERO Introducción teórica	23
1. ANOREXIA NERVIOSA	25
1.1. Epidemiología, curso y desenlace	25
1.2. Origen del término “anorexia nerviosa”	25
1.3. Diagnóstico de la anorexia nerviosa.....	26
1.4. Recorrido histórico en la concepción y el tratamiento de la anorexia nerviosa	29
1.4.1. La concepción multidisciplinar actual	33
1.5. Los tratamientos psicosociales y farmacológicos en la actualidad (tratamientos basados en la evidencia).....	34
1.5.1. Tratamientos psicosociales	34
1.5.2. Tratamientos farmacológicos.....	37
1.5.3. Conclusiones con respecto a los tratamientos disponibles para la anorexia nerviosa.....	39
2. EL USO DE MODELOS ANIMALES EN LOS TRASTORNOS PSIQUIÁTRICOS Y EN LA ANOREXIA NERVIOSA.....	40
3. HIPERACTIVIDAD EN ANIMALES SOMETIDOS A PROGRAMAS DE RESTRICCIÓN DE COMIDA.....	41
3.1. El modelo ABA.....	42
3.1.1. Descripción y particularidades del modelo ABA	44
3.1.2. Factores que afectan al desarrollo de ABA.....	46
3.1.3. Similitudes y diferencias entre la Anorexia Basada en la Actividad y el trastorno de anorexia nerviosa.....	46
3.2. El modelo SIH.....	49
4. LA HIPERACTIVIDAD EN LA ANOREXIA NERVIOSA Y EN LOS MODELOS ANIMALES.....	50
4.1. ¿Por qué las ratas corren en una rueda de actividad?.....	50
4.2. La hiperactividad como la Cenicienta de los signos y síntomas de la anorexia nerviosa	51
4.3. Prevención y reversión de la actividad en el modelo ABA.....	52
4.4. Efecto de la temperatura ambiental en el modelo ABA: La hiperactividad como mecanismo de termorregulación	53
4.4.1. “Activity-Based Anorexia: Ambient temperature has been a neglected factor” (Gutiérrez et al., 2002).....	53

4.4.2.	La interpretación termorregulatoria de la actividad	55
4.4.3.	Evidencia a favor de la teoría de la termorregulación en el modelo ABA.....	56
4.4.4.	Efecto de la temperatura ambiental en pacientes con anorexia nerviosa	57
4.5.	La teoría de la hipoleptinemia como causa de la hiperactividad	59
OBJETIVOS	63
CAPÍTULO SEGUNDO Material y método	67
1.	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y CUIDADOS	69
2.	PROCEDIMIENTOS NO QUIRÚRGICOS.....	70
2.1.	Monitorización de la ingesta y el peso corporal	70
2.2.	Manipulación del estado nutricional.....	70
2.3.	Monitorización de la actividad en la rueda.....	70
2.4.	Monitorización de la temperatura corporal.....	70
2.5.	Medición de la temperatura del BAT	70
2.6.	Preparación de minibombas osmóticas.....	71
3.	PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS	71
3.1.	Anestesia y analgesia (vías de administración)	71
3.2.	Implantación de telemetría	72
3.3.	Implantación de minibombas osmóticas.....	72
3.4.	Diseción y extracción de tejidos	72
4.	DISEÑOS EXPERIMENTALES	72
4.1.	Modelo de Anorexia Basada en la Actividad (ABA)	72
4.2.	Modelo de Hiperactividad Inducida por Semi-Inanición (SIH)	73
5.	TÉCNICAS ANALÍTICAS	74
5.1.	Análisis de proteínas por Western blot.....	74
5.1.1.	Extracción de proteína.....	74
5.1.2.	Cuantificación del extracto de proteína.....	75
5.1.3.	Preparación de las muestras para la electroforesis SDS-PAGE.....	75
5.1.4.	Preparación de los geles	75
5.1.5.	Electroforesis SDS-PAGE.....	76
5.1.6.	Transferencia semihúmeda.....	76
5.1.7.	Inmunodetección de proteínas.....	77
5.1.8.	Revelado y fijación de la señal.....	78
5.1.9.	Cuantificación de la señal.....	78

5.2.	Análisis de RNA mensajero por PCR en tiempo real	78
5.2.1.	Extracción de RNA	78
5.2.2.	Cuantificación de RNA.....	79
5.2.3.	Retrotranscripción (RT).....	80
5.2.4.	PCR en tiempo real	80
5.3.	Determinaciones séricas	82
5.4.	Histología	82
5.4.1.	Hematoxilina/eosina	83
5.4.2.	Inmunohistoquímica	83
5.4.3.	Tinción Oil Red	83
5.5.	Determinación de triglicéridos, colesterol y glucógeno hepático	83
5.5.1.	Extracción de grasa hepática.....	83
5.5.2.	Análisis de triglicéridos y colesterol hepáticos.....	84
5.5.3.	Extracción y análisis de glucógeno hepático	84
6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	84
	DESARROLLO EXPERIMENTAL	87
	CAPITULO TERCERO Comparación de la eficacia de la leptina y el aumento de la temperatura ambiental en la prevención de la hiperactividad en el modelo SIH.....	89
1.	INTRODUCCIÓN.....	91
2.	MÉTODO	92
2.1.	Sujetos	92
2.2.	Aparatos	92
2.3.	Procedimiento.....	92
2.4.	Análisis de ARN mensajero por PC-Real Time.....	93
2.5.	Análisis de proteína por Western blot	93
2.6.	Análisis estadístico	93
3.	RESULTADOS	94
3.1.	Primera Fase con comida ad libitum (AL)	94
3.2.	Segunda Fase de Restricción de alimento (RA).....	96
3.3.	Ciclo circadiano de la actividad y la temperatura corporal.....	97
3.4.	Niveles de RNA mensajero en el arcuato.....	100
3.5.	Niveles proteicos de UCP1 en BAT.....	101

4. DISCUSIÓN	102
CAPÍTULO CUARTO Efectos de la actividad basal, la temperatura ambiental, la dosis y tipo de leptina en el procedimiento SIH	107
1. INTRODUCCIÓN	109
2. MÉTODO.....	112
2.1. Sujetos.....	112
2.2. Aparatos	112
2.3. Procedimiento	112
2.3.1. Procedimiento SIH con fase AL de dos semanas de duración	112
2.4. Análisis de leptina en sangre	115
2.5. Análisis de proteína por Western blot	115
2.6. Análisis estadístico	115
3. RESULTADOS.....	115
3.1. ¿Una excesiva actividad basal impide que la leptina ejerza el efecto inhibitor sobre la hiperactividad?.....	115
3.1.1. Primera Fase con comida ad libitum (AL)	116
3.1.2. Segunda Fase de Restricción de alimento (RA).....	118
3.1.3. Ciclo circadiano de la actividad y la temperatura corporal	120
3.2. Efecto de la leptina sobre la ingesta	123
3.2.1. Estudio de la ingesta en ratas ad libitum	125
3.2.2. Ciclo circadiano de la actividad y la temperatura corporal	130
3.2.3. Niveles proteicos de UCP1 en el BAT	132
3.3. Efecto de la dosis de leptina sobre la actividad	133
3.3.1. Ciclo circadiano de la actividad y la temperatura corporal	138
3.4. Efecto de la leptina recombinante de ratón sobre la actividad en el procedimiento SIH.....	142
3.4.1. Ciclo circadiano de la actividad y la temperatura corporal	146
4. DISCUSIÓN	148
CAPÍTULO QUINTO Implicación de AMPK en las consecuencias del modelo ABA y en la reversión con calor	155
1. INTRODUCCIÓN	157
1.1. Regulación del metabolismo energético por el hipotálamo.....	157
1.1.1. Núcleo arcuato (ARC).....	158

1.1.2.	Núcleo ventromedial (VMH).....	159
1.1.3.	Área hipotalámica lateral (LHA)	160
1.1.4.	Núcleo paraventricular (PVH).....	161
1.1.5.	Núcleo dorsomedial (DMH)	161
1.2.	Gasto energético y termogénesis.....	162
1.3.	AMPK	163
2.	MÉTODO	166
2.1.	Sujetos	166
2.2.	Aparatos	166
2.3.	Procedimiento.....	166
2.4.	Técnicas analíticas.....	167
2.5.	Análisis estadístico	168
3.	RESULTADOS	168
3.1.	Estudio de la termogénesis adaptativa y la posible implicación de la vía de señalización de AMPK en el modelo ABA.....	168
3.1.1.	Procedimiento ABA: el aumento de la temperatura ambiente hasta 32°C revierte las consecuencias del modelo ABA	168
3.1.2.	Estudio del tejido adiposo pardo: El aumento de la temperatura ambiente hasta 32°C redujo la termogénesis en el BAT	172
3.1.3.	El estudio de la ruta de AMPK en hipotálamo entero de rata no detectó diferencias significativas	173
3.1.4.	Estudio de la vía de AMPK en dos núcleos hipotalámicos: VMH y ARC... 174	
3.1.5.	Estudio de la ruta de AMPK en el hígado: la lipogénesis de novo no está mediada por AMPK.....	175
3.1.6.	Estudio de marcadores de lipogénesis, lipólisis y browning en el tejido adiposo blanco....	177
3.1.6.1.	El calor revierte la disminución en los marcadores de lipogénesis en WAT.....	177
3.1.6.2.	Browning.....	178
3.1.7.	Estudio de marcadores de caquexia en el músculo esquelético.....	179
3.1.8.	Estudio de diferentes metabolitos en suero.....	180
3.1.9.	Estudio de otras rutas implicadas en la regulación del metabolismo energético: ER STRESS (VMH), ruta de mTOR (ARC) y marcadores de inflamación hipotalámico (VMH).....	181
3.2.	Estudio de la termogénesis adaptativa y la implicación de la vía de señalización de AMPK en el modelo ABA en comparación con un grupo activo ad libitum.....	183
3.2.1.	Procedimiento ABA.....	184

3.2.2. Comparación metabólica de una rata activa con alimentación ad libitum y una rata inactiva con restricción de alimento.....	188
3.2.3. ¿Qué ocurre cuando a una rata con restricción calórica es expuesta a un ambiente cálido?	190
3.2.4. Comparación metabólica de ratas expuestas al procedimiento ABA con respecto animales expuestos bien a restricción de alimento o bien con acceso a rueda de actividad.....	193
3.2.5. Comparación metabólica de animales expuestos al procedimiento ABA a temperatura estándar con animales expuestos a ABA que se recuperan al incrementar la temperatura ambiental.....	195
4. DISCUSIÓN	197
CAPÍTULO SEXTO Resumen, conclusiones y líneas futuras de investigación.....	203
1. IMPLICACIONES EN EL ÁMBITO CLÍNICO.....	205
2. LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN.....	207
3. RESUMEN Y CONCLUSIONES	208
BIBLIOGRAFÍA	213
ANEXO 1.....	265
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	267
FINANCIACIÓN.....	275
DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES.....	275

CAPÍTULO PRIMERO

Introducción teórica





1. ANOREXIA NERVIOSA

1.1. EPIDEMIOLOGÍA, CURSO Y DESENLACE

La anorexia nerviosa es un trastorno mental grave que afecta entre el 0.2-1% de las mujeres jóvenes entre los 12 y los 20 años (Berkman, Lohr, & Bulik, 2007; Favaro, Caregaro, Tenconi, Bosello, & Santonastaso, 2009; Halmi, 2009; Micali, Hagberg, Petersen, & Treasure, 2013; Mitchison & Hay, 2014). Es un trastorno que afecta en su mayoría a mujeres, pero puede darse en hombres en una proporción mucho menor, en torno a uno de cada diez mujeres¹ (Favaro, Ferrara, & Santonastaso, 2003; Hoek & van Hoeken, 2003; Raevuori et al., 2009). Si bien se detectó un aumento en la prevalencia de la anorexia nerviosa tanto en mujeres como en hombres (Hudson, Hiripi, Pope, & Kessler, 2007; Smink, van Hoeken, & Hoek, 2012; Steinhausen, 2002) algunos autores sugieren que podría estar relacionado con una mejor y más temprana detección del trastorno, una mejora en el diagnóstico, el tratamiento o el aumento de la disposición de servicios de tratamiento (Raevuori, Keski-Rahkonen, & Hoek, 2014; Smink et al., 2012). La etiología de la anorexia nerviosa es muy compleja, considerando elementos biológicos, psicológicos y sociales como factores de riesgo y de mantenimiento del trastorno (Culbert, Racine, & Klump, 2015; Treasure et al., 2015; Zipfel, Giel, Bulik, Hay, & Schmidt, 2015) y suele desembocar en la cronicidad (Eddy et al., 2017; Mitchell & Bulik, 2006; Steinhausen, 2002; Zipfel, Löwe, Reas, Deter, & Herzog, 2000). Está considerado como el trastorno psiquiátrico con mayor tasa de mortalidad (Arcelus, AJ, Wales, & Nielsen, 2011; Button, Chadalavada, & Palmer, 2010; Schmidt et al., 2016; Treasure et al., 2015), aunque un estudio de metaanálisis con 41 estudios concluyó que la anorexia nerviosa no tiene necesariamente una mayor tasa de mortalidad que otros trastornos psiquiátricos (Keshaviah et al., 2014). Por otro lado, estudios con neuroimagen han detectado cambios en la estructura y función cerebral de pacientes con anorexia nerviosa, tales como la reducción en el volumen de sustancia gris y blanca, tanto al inicio de la enfermedad como en fase de recuperación (Monzon, Hay, Foroughi, & Touyz, 2016; Seitz, Herpertz-Dahlmann, & Konrad, 2016). Actualmente, no existe ningún tratamiento farmacológico ni psicológico eficaz para la anorexia nerviosa, aspecto que revisaremos más adelante (Davis & Attia, 2017; Fairburn, 2005; Miniati et al., 2016; Treasure, 2010).

1.2. ORIGEN DEL TÉRMINO “ANOREXIA NERVIOSA”

El término de “anorexia” significa pérdida de apetito. Etimológicamente proviene del griego, así “orexis” significa apetito, y el prefijo “an” significa “ausencia de”. Aunque en las pacientes la pérdida de apetito como tal no se produce hasta estados muy avanzados de la enfermedad, este término se mantiene en la actualidad.

La primera vez que se describió clínicamente este trastorno fue en el siglo XVII por un médico inglés, Richard Morton (1694). En uno de sus libros describe con detalle el caso de una paciente de 18 años con cierta sintomatología que denominó “consunción nerviosa” y que diferenció de la tuberculosis. Estos síntomas hacen referencia a una gran energía física e intelectual a pesar de mostrar una extrema delgadez y amenorrea, que se diferencia de la

¹ Debido a esta desproporción entre hombres y mujeres con anorexia nerviosa, de aquí en adelante se utilizará el femenino en el texto.

tuberculosis (frecuente en la época) porque no presenta fiebre, tos, o dificultades respiratorias o pulmonares. También describe la sensación de frío, un reducido apetito y molestias digestivas, además de la ausencia de conciencia de enfermedad por parte de la paciente. Por lo tanto, hace más de 300 años, se reconocen los síntomas principales que sirven en la actualidad para realizar el diagnóstico de anorexia nerviosa, siendo la ausencia de apetito, la amenorrea y la vigrosidad a pesar de la desnutrición de las pacientes.

Posteriormente a la descripción de Morton, se realizaron otras que probablemente se refirieran a pacientes con anorexia nerviosa y que fueron denominadas como “atrofia nerviosa” (Whytt, 1765) o “delirio hipocondríaco” (Marce, 1860). No obstante, a finales del siglo XIX, surgieron en Europa dos magníficas descripciones casi al mismo tiempo, y que supuso en el caso de una de ellas la acuñación del término tal y como hoy lo conocemos. La primera de estas descripciones surgió en el año 1873 de la mano de Charles Lasègue, un psiquiatra francés (Lasègue, 1873). Lasègue describió en su artículo “*De l’anorexie hystérique*”, nueve casos del trastorno desde una perspectiva psicológica, los cuales denominó como “anorexia histérica”, pues estaban fundamentados en las observaciones del estado psicológico de las pacientes y en el relevante papel que la familia juega en la evolución del trastorno. Un año después, Sir William Gull, un médico inglés, también describió tres casos del trastorno, que acuñó como “anorexia nerviosa” (1874), pero desde una perspectiva estrictamente médica haciendo hincapié en el menoscabo físico de las pacientes (Gull, 1874).

A pesar de que la descripción de Lasègue fue publicada un año antes que la de Gull, fue este último el que se hizo con el mérito de la acuñación del término “anorexia nervosa”. De hecho, el título de su artículo en el que propone el término de anorexia nerviosa, “*Anorexia nervosa (apepsia hysterica, anorexia hysterica)*” (1874), trata además de integrar el término de Lasègue, “anorexia histérica” y el de “apepsia histérica”. Este último fue utilizado por él mismo de forma breve en un discurso que expuso en 1868 en el encuentro anual de la *British Medical Association* (Gull, 1868), para referirse a los casos de desnutrición en jóvenes que no padecen tuberculosis². Así, William Gull pasó a la historia como la persona que describió y acuñó el trastorno de la anorexia nerviosa, aunque de forma discutible, ya que es probable que fuera conocedor del trabajo de Lasègue (Vandereycken & Van Deth, 1989). En consecuencia, la mención del término *apepsia hysterica* utilizado en 1868 dentro de su artículo de 1874, en el que hace una descripción más exhaustiva del trastorno y en el que aclara que con ese término se refería a la anorexia histérica de Lasègue, podría haber sido una estrategia para reclamar para sí el mérito.

1.3. DIAGNÓSTICO DE LA ANOREXIA NERVIOSA

A lo largo de la historia, el concepto de anorexia nerviosa ha sufrido diferentes cambios, los cuales abordaremos más adelante, que han dado lugar al sistema de clasificación diagnóstica actual.

Existen dos sistemas de clasificación de las enfermedades mentales que son aceptados y utilizados internacionalmente: el DSM, de la Asociación Americana de Psiquiatría (APA) y el CIE, de la Organización Mundial de la Salud (OMS), los cuales tienen unos criterios de

² Cinco años después de su discurso, el 24 de Octubre de 1873 con motivo de la XXIV reunión de la Clinical Society de Londres Gull leyó una comunicación titulada “Anorexia hysterica” (Gull, 1873), pero esta que fue publicada un año más tarde en Transactions of the Clinical Society of London (Gull, 1874), pero esta vez el título fue el ya mencionado de “*Anorexia nervosa (apepsia hysterica, anorexia hysterica)*”, en el que aparece por primera vez el término de anorexia nerviosa.

clasificación similares. A lo largo de la historia, estas clasificaciones trataron de delimitar la esencia de la anorexia nerviosa centrándose en tres criterios: una pérdida de peso autoimpuesta, un trastorno endocrino que se pone de manifiesto a través de la presencia de amenorrea, y el miedo a la obesidad o fobia al peso (Crisp, 1970).

La relevancia e inclusión de estos criterios derivaron, en un primer momento, de un exhaustivo análisis realizado por Gerald Russell de los síntomas que han permanecido estables desde las primeras descripciones de Charles Lasègue y William Gull, y especialmente sobre aquellos que, durante los últimos 30 años, se sostienen como centrales para el diagnóstico de la anorexia nerviosa (Russell, 1984, 1985, 1995, 2003; Russell & Treasure, 1989). Pero estos tres criterios no estuvieron exentos de debate, tal y como pasamos a explicar a continuación, centrándonos como se refleja en la Tabla 1, sobre los cambios realizados en la clasificación diagnóstica de la APA en sus dos últimas versiones, el DSM-IV-TR (APA, 2000) y el DSM-V (APA, 2013), debido a que en el momento de redacción de esta tesis la nueva versión de la clasificación diagnóstica de la OMS, el CIE-11, no está disponible, pues no será presentada de forma oficial hasta mayo de **2019**.

Con respecto al tercer criterio, los trastornos de la imagen corporal fueron considerados por el propio Russell como un elemento esencial de la anorexia nerviosa desde 1984, a pesar de que esta característica no aparece en las descripciones realizadas por Gull o Lasègue, haciendo que en 2003 ponga en duda que “la moderna fenomenología del miedo a la obesidad (fobia al peso) sea una característica permanente y esencial de la anorexia nerviosa” (Russell, 2003, p.25). Además, en los años 90 aparecen los primeros estudios que muestran la ausencia de miedo a engordar, principalmente en poblaciones fuera del espacio anglosajón. En el año 2009 se publicó una revisión al respecto en que se incluyen estos estudios y otros realizados con pacientes occidentales en el que la fobia a engordar no está presente en las pacientes con anorexia nerviosa (Becker, Thomas, & Pike, 2009). Otros autores sugieren que se construye socialmente en encuentros clínicos (Lee, 1993). Así, diversos autores plantearon la modificación o eliminación de este criterio en futuras versiones del DSM (Habermas, 1996; Hebebrand, Casper, Treasure, & Schweiger, 2004; Hsu & Lee, 1993; R. L. Palmer, 1993).

La presencia de la amenorrea aparece por primera vez, como nota informativa, en el DSM-III (APA, 1980), convirtiéndola en una característica esencial de la anorexia nerviosa, pero no fue considerado un criterio formal hasta su versión revisada, en el DSM-III-R, siete años después (APA, 1987). Probablemente este criterio y su conveniencia como tal para el diagnóstico de la anorexia nerviosa, fue el que generó más debate. Esto es así debido a que un tercio de las pacientes que presentan un índice de masa corporal (IMC) por debajo del 17.5%, no presentan amenorrea (Gendall et al., 2006). Tampoco la ausencia de amenorrea en las pacientes supone diferencia alguna con respecto a su presencia en relación con la psicopatología en sí misma, u otros aspectos como son la personalidad, la comorbilidad psiquiátrica, historia familiar, o experiencias infantiles (Abraham, Pettigrew, Boyd, & Russell, 2006; Abraham, Pettigrew, Boyd, Russell, & Taylor, 2005; Bulik, Sullivan, & Kendler, 2000; Cachelin & Maher, 1998; Dalle Grave, Calugi, & Marchesini, 2008; Garfinkel et al., 1996; Poyastro Pinheiro et al., 2007; Roberto, Steinglass, Mayer, Attia, & Walsh, 2008; Walters & Kendler, 1995; Watson & Andersen, 2003). Además, las diferencias que han surgido en estos estudios que comparan pacientes con anorexia nerviosa con y sin amenorrea, son un reflejo del estado nutricional, al igual que la recuperación de la menstruación se relaciona más con factores nutricionales (Attia & Roberto, 2009; Copeland, Sacks, & Herzog, 1995; Golden et al., 1997; Smith & Wolfe, 2008). Por otra parte, este criterio añade otra problemática y es que no puede

ser aplicado a hombres, a mujeres con menopausia o que están tomando anticonceptivos orales, ni tampoco en mujeres que son demasiado jóvenes para ser diagnosticadas de amenorrea primaria o que el inicio de la enfermedad ha sido reciente³ (Attia & Roberto, 2009). Así, la amenorrea no añade más especificidad al diagnóstico (Mitchell, Cook-Myers, & Wonderlich, 2005) por lo que este criterio fue eliminado en la última versión del DSM publicado en el año 2013 (DSM-V; APA, 2013).

Criterios diagnósticos de la anorexia nerviosa	
DSM-IV-TR (APA, 2000)	DSM-V (APA, 2013)
A. Rechazo a mantener el peso corporal igual o por encima del valor mínimo normal considerando la edad y la talla (p. ej., pérdida de peso que da lugar a un peso inferior al 85 % del esperable, o fracaso en conseguir el aumento de peso normal durante el período de crecimiento, dando como resultado un peso corporal inferior al 85 % del peso esperable).	A. Restricción de la ingesta energética en relación con las necesidades, que conduce a un peso corporal significativamente bajo con relación a la edad, el sexo, el curso del desarrollo y la salud física. Peso significativamente bajo se define como un peso que es inferior al mínimo normal o en niños y adolescentes, inferior al mínimo esperado.
B. Miedo intenso a ganar peso o a convertirse en obeso, incluso estando por debajo del peso normal.	B. Miedo intenso ganar peso o a engordar, o comportamiento persistente que interfiere en el aumento de peso, incluso con un peso significativamente bajo.
C. Alteración de la percepción del peso o la silueta corporales, exageración de su importancia en la autoevaluación o negación del peligro que comporta el bajo peso corporal.	C. Alteración en la forma que uno mismo percibe su propio peso o constitución, influencia impropia del peso o la constitución corporal en la autoevaluación, o falta persistente de reconocimiento de la gravedad del bajo peso corporal actual.
D. En las mujeres pospuberales, presencia de amenorrea; por ejemplo, ausencia de al menos tres ciclos menstruales consecutivos.	D. Omitido

Tabla 1. Criterios diagnósticos de la anorexia nerviosa en las versiones DSM-IV-TR y DSM-V.

Por último, el primer criterio referido a la pérdida de peso, si bien parece el más estable y definitorio también ha sido fuente de debate, y del que Hebebrand & Bulik (2011) hacen un profundo análisis en su artículo “*Critical appraisal of the provisional DSM-5 criteria for anorexia nerviosa and a alternative proposal*” ante las primeras propuestas que surgieron para la publicación del DSM-V (Hebebrand & Bulik, 2011). Así, se hace hincapié en el término “rechazo”, el cual genera connotaciones negativas al dotar a la persona de intención o voluntariedad a padecer la enfermedad, promoviendo la estigmatización (Becker, Eddy, & Perloe, 2009). Además, este aspecto no aparece en las primeras descripciones del trastorno realizadas por Gull y Lasègue y resulta muy difícil de demostrar, desapareciendo en la última versión del DSM, puesto que como expresaron Hebebrand, Casper, Treasure y Schweiger: “*the aim of modern diagnostic schemes is to be descriptive and non-judgmental; only criteria that are based on firm scientific evidence are to be included*” (2004, p.828). Por otra parte, también se pone de manifiesto la indefinición intrínseca del término “valor mínimo normal”, o “peso inferior del esperable”, cuya redacción fue modificada en el DSM-V para su aclaración además

³ Cómo se puede observar en la Tabla 1, en el DSM-IV-TR la presencia de amenorrea debe darse durante un mínimo de 3 ciclos menstruales, por lo que una paciente podría ser diagnosticada de anorexia nerviosa, aunque la menstruación no haya desaparecido el tiempo suficiente para cumplir el criterio.

de incluir en el texto orientación sobre cómo juzgar si el peso de un individuo es “significativamente bajo” (Attia et al., 2013). Por otro lado, si bien en el DSM-V se elimina de sus criterios diagnósticos el uso de un punto de corte respecto al peso corporal para el diagnóstico del trastorno, la APA propone puntos de corte basados en el IMC o el percentil ajustado a la edad, en pacientes adultos y adolescentes. Un estudio reciente ha demostrado la poca capacidad diagnóstica de esta característica, alertando de que puede dificultar el diagnóstico temprano en niños y adolescentes y el inicio del tratamiento (Andersen, Lindgreen, Rokkedal, & Clausen, 2018). Hebebrand & Bulik (2011), por su parte, sugieren el uso de una lista de síntomas que hacen referencia al daño derivado de la pérdida de peso y también del uso del IMC, tal y como aparece en el CIE-10 (OMS, 1992).

En conclusión, los criterios diagnósticos para la anorexia nerviosa no han cambiado conceptualmente con respecto al DSM-IV, a excepción de la eliminación del requisito para la amenorrea (Attia et al., 2013). El sistema DSM maneja una amplia influencia en el sistema de atención sanitaria y en las opiniones de la sociedad sobre el comportamiento y las enfermedades mentales (y por ende de la anorexia nerviosa), por lo que deberían reflejar el progreso en el campo y proporcionar una base para la futura investigación y mejorar la atención de las personas que la padecen, sirviendo como un jurado imparcial para considerar las ideas y propuestas que se extraen de los anteriores debates (Walsh, 2007).

1.4. RECORRIDO HISTÓRICO EN LA CONCEPCIÓN Y EL TRATAMIENTO DE LA ANOREXIA NERVIOSA

A lo largo de la historia de la anorexia nerviosa, esta se concibió desde diferentes perspectivas por lo que se la trató bien como una enfermedad estrictamente médica o bien como un trastorno psicológico, desarrollando tratamientos de acuerdo con cada uno de estos planteamientos sin éxito alguno. Actualmente, la concepción imperante es una perspectiva multidimensional en el que factores somáticos, psicológicos y sociales intervienen en la predisposición, el desarrollo y el mantenimiento del trastorno. Pero esta nueva perspectiva no ha supuesto una mejora en los tratamientos pues su eficacia oscila en torno al 50% (Attia & Walsh, 2009).

Desde su concepción original en lo que se considera la época moderna los planteamientos de Gull y Lasègue hicieron hincapié en el origen psicológico o mental del trastorno. Para Lasègue la anorexia nerviosa constaría de tres fases en las cuales el papel de la familia resulta determinante. Así, en una primera fase, la paciente muestra su malestar al comer, restringe su alimentación y aumenta su actividad física, mientras que los padres ejercen presión para aumentar la ingesta. En la segunda fase, se produce un empeoramiento del estado mental de la paciente y aparece una menstruación irregular y estreñimiento, lo que obliga a los padres a buscar la intervención médica. En la tercera y última fase, el desgaste físico es evidente, con amenorrea, atrofia gástrica, anemia y desmayos. Si bien Lasègue describe un enfoque fundamentalmente orgánico también señala la importancia en que la relación entre los padres y las hijas constituyen el escenario para el desarrollo de la anorexia nerviosa, por lo que considera necesaria la separación de las pacientes de sus familias y ponerse en manos de un profesional médico (Lasègue, 1873). Gull, por su parte, aunque con una perspectiva médica, coincide con Lasègue en la incapacidad de la paciente y su familia para superar la enfermedad.

En el primer tercio del siglo XX, la perspectiva imperante en la concepción y tratamiento de la anorexia nerviosa fue estrictamente médica. Se trata de un momento en la historia en el

que el interés por los trastornos endocrinos está en alza, especialmente a partir de 1914 cuando se describe el Mal de Simmond como una afectación hipofisaria que produce una desnutrición extrema. En consecuencia, la anorexia nerviosa perdió su entidad diagnóstica propia y fue concebida como un trastorno endocrino y su tratamiento consistía en preparados hormonales y mezclas de insulina y complejos vitamínicos (Brumberg, 1985; Gordon, 1998). De hecho, se calcula que cerca de 600 casos diagnosticados como Mal de Simmond en la literatura, sólo 101 podrían ser casos reales de esta afección (Escamilla & Lissner, 1942).

Esta situación se mantuvo hasta finales de los años 30 cuando, junto con el reconocimiento de que los tratamientos hormonales no son eficaces, surgieron diferentes trabajos que hablaban de las diferencias entre el Mal de Simmonds y la anorexia nerviosa, poniendo el énfasis de nuevo en los factores psicológicos y su impacto en la función endocrina (Berkman, 1939; Bruchner, Wies, & Lavietes, 1938; Cross, 1939; Evans, 1939; Farquharson, 1941; McCullagh & Tupper, 1940; Morlock, 1939; Palmer & Jones, 1939; Parde, 1941; Farquharson & Hyland, 1938; Richardson, 1939; Ryle, 1936). De todos estos trabajos, los que tuvieron mayor impacto fueron los de Ryle, (1936) y Richardson, (1939). Paralelamente al renacimiento de la importancia de los aspectos psicológicos en la etiología de la anorexia nerviosa, surgen recomendaciones para su tratamiento que están relacionadas con aquellas que Lasègue propuso en su momento; el tratamiento consistiría en que la paciente entrase en contacto con un terapeuta que trataría de ganarse su colaboración a través de simples y sinceras conversaciones, manejando la situación con firmeza y amabilidad (Ryle, 1939; Yellowless, 1939). En estas conversaciones se insistiría en los beneficios de la alimentación para poder revertir el proceso de inanición para posteriormente, cuando el terapeuta ya se ha ganado la colaboración de la paciente, promover su deseo de recuperación. Se trata, por lo tanto, de un tratamiento poco elaborado en el que no es necesario profundizar en las razones que llevaron a la paciente a su estado (Hurst, 1939). De hecho, Ryle y Yellowlees consideran innecesario el uso de sofisticadas psicoterapias o métodos para reestablecer el estado nutricional de las pacientes con anorexia nerviosa. Todas estas recomendaciones fueron recogidas de una conferencia presentada por el propio Ryle (1939), y cuyas palabras y la de colegas presentes, fueron plasmadas en las páginas del "Proceedings of the Royal Society of Medicine".

Con la aparición del psicoanálisis a escena, la concepción psicoanalítica pasa a dominar la conceptualización y tratamiento de la anorexia nerviosa, ignorando las recomendaciones de la Royal Society of medicine de Londres, en las que incluso se consideraba el psicoanálisis como una pérdida de tiempo (Weber, 1939). En 1939, el psiquiatra George Alexander publica un caso en el que una joven explica como al conocer el embarazo de una compañera de colegio hace que deje de comer por miedo a terminar igualmente embarazada, ya que en la época estaba extendida la idea infantil de que tragarse algo podía provocar el crecimiento de un bebé en la barriga (Alexander, 1939). Así, basándose en confesiones y simbolismos, la anorexia nerviosa pasa a ser considerada por el psicoanálisis como una expresión del rechazo de la sexualidad y de la defensa frente a los deseos de impregnación oral (Waller, Kaufman & Deutsch, 1940). Por lo tanto, se trata de un conflicto más profundo en el que la neurosis debe ser el foco principal de actuación por parte del médico (Du Bois, 1949), centrándose en la naturaleza del conflicto y las relaciones entre las pacientes y sus familiares (Lorand, 1964; Moulton, 1942; Sours, 1974) en detrimento de la atención sobre el problema de desnutrición.

Otra explicación psicoanalítica de la anorexia nerviosa hace referencia a un sentimiento de dependencia y los problemas de autonomía de las pacientes adolescentes que se denomina "infantilismo psicológico" (Eissler, 1943; Lorand, 1943). Así, esta interpretación se basa en la

relación que la paciente con anorexia nerviosa mantiene con su madre, en el que la comida tiene una carga emocional que representaría el “amor de la madre hacia sus hijos”. La paciente en su intento de lograr la autonomía se enfrenta a su deseo inconsciente de “dependencia infantil” demandando la atención de la madre a través del rechazo de la comida.

Retomando el primer planteamiento psicoanalítico, como ya hemos comentado, se trataba de un enfoque en el que no se tenía en cuenta la inanición que padecen las pacientes, desatendiendo las consecuencias físicas asociadas a esta, ya que lo principal era el conflicto interno. Esta corriente dominará el pensamiento psiquiátrico durante veinte años hasta que, debido a la cada vez más patente ineficacia de las terapias psicoanalíticas, junto con la aparición de trabajos que evidencian los efectos psicológicos derivados de la desnutrición, modifican el rumbo conceptual de la anorexia nerviosa incluyendo el restablecimiento del estado nutricional en el tratamiento.

Quizás el trabajo crucial que describió como la inanición misma puede producir cambios en la personalidad y el comportamiento fue el realizado por Ancel Keys en la Universidad de Minnesota (Keys, Brozek, Henschel, Mickelsen, & Taylor, 1950). En este estudio participaron 36 hombres que voluntariamente se sometieron a una restricción calórica progresiva a lo largo de 6 meses, hasta alcanzar una pérdida de peso del 25% con respecto a su peso inicial. Por las características de selección de los voluntarios que se presentaban física y mentalmente sanos, nada hacía presagiar los resultados que se obtuvieron. Una vez que la restricción en la dieta tuvo lugar empezaron a producirse cambios drásticos que afectaron tanto al espectro físico como psicológico y de las relaciones interpersonales. En cuanto a los cambios físicos, los autores describen una disminución en la necesidad de sueño, la disminución de la temperatura corporal, mayor intolerancia al frío, disminución de la frecuencia cardíaca y respiratoria y molestias gastrointestinales⁴. Por otro lado, estas manifestaciones van acompañadas de un aumento de las preocupaciones relacionadas con la comida, llegando incluso a coleccionar utensilios y recetas de cocina, comiendo más lento y cortando la comida en pequeños trozos. También se vuelven más irritables, ansiosos, depresivos y neuróticos (de hecho, algunos voluntarios tuvieron que abandonar el estudio debido a su sintomatología psicótica). Con respecto a las relaciones interpersonales, el aislamiento social y la pérdida de interés por el sexo opuesto eran características del grupo de voluntarios a medida que se acercaban al final del estudio (Franklin, Schielle, Brozek & Keys, 1948). En resumen, la restricción calórica en el estudio de Minnesota reprodujo la aparición de características que se asemejaban a las manifestaciones psicopatológicas típicas de las pacientes con anorexia nerviosa, a pesar de no pertenecer a un grupo de riesgo, puesto que (además de sus óptimas condiciones físicas y mentales) los voluntarios eran hombres y con una edad comprendida entre los 20 a 33 años, aspectos que se relacionan con una baja incidencia de anorexia.

Este estudio supuso la demostración de que muchos signos y síntomas que se dan en la anorexia nerviosa son el resultado directo de la inanición, como ya habían señalado anteriormente otros autores (Berkman, 1944; Shiele & Brozek, 1948), por lo que la renutrición pasa a formar parte central del tratamiento, aunque se convierte en una tarea más complicada de lo que Gull manifestaba en sus recomendaciones, tal y como Dally & Sargant (1960) subrayaban en sus manifestaciones cuando afirmaban: “*lo poco inclinadas hacia la comida a pesar de toda la persuasión, moral o de otro tipo, que se emplee*” de las pacientes, llegando incluso a que “*un 15% de los pacientes en seguimiento habían muerto de la enfermedad o sus*

⁴ Curiosamente, todas estas descripciones fueron corroboradas en las pacientes con anorexia nerviosa en el artículo mencionado de Arthur Crisp (1970) a pesar de que este autor no hace mención del trabajo de Keys et al (1950).

complicaciones” (p. 1770). También destacan la ineficacia de los tratamientos empleados hasta la fecha como los preparados hormonales, la terapia electroconvulsiva o la alimentación por sonda nasogástrica y proponen un nuevo método en el *“que se combina el tratamiento con insulina con dosis elevadas de clorpromacina”* (Dally, Oppenheim, & Sargant, 1958, p. 633).

A partir de principios de la década de los años 60 surge una nueva concepción de la anorexia nerviosa, de la mano de la psicoanalista de origen alemán Hilde Bruch, considerada actualmente como la figura más influyente en el campo y cuyo planteamiento es considerado domina en la actualidad. A pesar de su amplia formación en psicoanálisis, Bruch rechazó el modelo psicoanalítico de la anorexia nerviosa basado en impulsos sexuales, referenciando su falta de preocupación por la pérdida de peso, a favor de un modelo basado en el apego y las primeras dificultades sociales (Treasure & Cardí, 2017).

Para Bruch, existe un desequilibrio que se produce en la infancia entre las respuestas apropiadas a los indicios internos del niño y la estimulación que procede del exterior, especialmente en relación con la madre y la comida, aunque también con respecto a estados afectivos. Así, la madre no es capaz de reconocer correctamente las señales y necesidades internas del niño, dando una respuesta inapropiada o contradictoria para la reducción de tensiones y su satisfacción inmediata. Esta situación, al producirse de forma continuada impide un desarrollo apropiado de la autonomía del niño, que colapsará en la adolescencia con la manifestación de la anorexia nerviosa. La anorexia nerviosa, según Bruch, constaría de tres síntomas: una distorsión de la imagen corporal, la alteración en la percepción de las sensaciones viscerales y afectivas y un paralizante sentimiento de ineficacia y competencia (Bruch, 1961, 1962, 1966, 1969, 1970a, 1982). Los dos primeros síntomas son considerados por Bruch como patognomónicos, es decir, cuya presencia asegura el padecimiento del trastorno. En cuanto a la distorsión de la imagen corporal, se trata de una desconexión entre la realidad de la forma y el cuerpo de la paciente y de cómo ellas se ven. Por lo tanto, las pacientes carecen de conciencia de su desnutrición, aun cuando es avanzada, y muestran miedo a engordar. La alteración en la percepción hace referencia a la inexactitud en la percepción o interpretación cognitiva de los estímulos procedentes del cuerpo, especialmente para reconocer signos de las necesidades nutricionales (hambre y saciedad), pero también del estado emocional (ansiedad, depresión). Otro signo de la anorexia nerviosa que se incluiría dentro de esta categoría hace referencia a la hiperactividad y a la negación de fatiga y debilidad a consecuencia de la desnutrición. Por último, a consecuencia de su incapacidad para valorar y transmitir las sensaciones internas, *“las pacientes se experimentan a sí mismas como actuando solo en respuesta a las demandas provenientes de otras personas y situaciones, y no haciendo nada porque quieren”* (Bruch, 1966, p. 562), contribuyendo a una sensación de ineficacia y una general falta de conciencia de vivir la propia vida.

Con respecto al tratamiento de la anorexia nerviosa, Bruch propone abandonar el enfoque tradicional psicoanalítico por otro centrado en los hechos y no en las interpretaciones (Bruch, 1974). La tarea terapéutica pasa por hacer conscientes los sentimientos e impulsos de las pacientes, corrigiendo la confusión conceptual, para posteriormente evaluar lo apropiado de los mismos, ayudando a buscar la autonomía y la identidad. Para ello, adopta una postura *“ingenua”* de escucha a la paciente y estimula la curiosidad y sensibilidad de la paciente hacia ella misma, convirtiéndola en sujeto activo en su proceso terapéutico (Bruch, 1970b). Por otro lado, se evita una actitud de superioridad en la que se le dice a la paciente lo que debe sentir y pensar, ya que esto refuerza su inadecuación, menoscabando el desarrollo de una autoconciencia y confianza en sus recursos psicológicos.

Sin embargo, estas recomendaciones en el tratamiento de la anorexia nerviosa no calaron tan hondo como su concepción de los elementos esenciales que conforman el trastorno. Más bien, el énfasis en la renutrición provocó la sustitución de la psicoterapia por programas operantes junto con una mayor presencia de tratamientos farmacológicos (Gutiérrez, 2011) que desembocó en el nacimiento de una nueva perspectiva, multidisciplinar, que dominará la concepción y tratamiento de la anorexia nerviosa hasta hoy en día.

1.4.1. La concepción multidisciplinar actual

Uno de los primeros antecedentes que hizo referencia a un tratamiento multidisciplinar de la anorexia nerviosa se puede encontrar en el artículo de Shiele & Brozek en 1948, ambos miembros del equipo de Ancel Keys en el estudio de Minnesota mencionado más atrás, en el que se explica que las diferentes manifestaciones producto de la inanición son el resultado de una compleja interacción entre factores anatómicos, fisiológicos, psicológicos y sociales. En los años 60 esta concepción fue definida con mayor precisión por Kidd & Wood (1966) haciendo referencia a una compleja interconexión entre disfunciones físicas, psicológicas, endocrinas, metabólicas y electrolíticas, en el que el tratamiento de la anorexia nerviosa debía considerar aspectos médicos, endocrinos, metabólicos y psiquiátricos de forma separada.

Un elemento imprescindible dentro del tratamiento multidisciplinar de la anorexia nerviosa son los programas operantes. Con el objetivo de restaurar el peso corporal, estos programas se instalan en los internamientos hospitalarios organizando las contingencias que regulan el día a día de las pacientes, por ejemplo, el tiempo que el paciente puede pasar fuera de cama o fuera de la unidad, límites y recompensas en relación al ejercicio físico, privilegios vinculados al logro de metas como el peso o comportamiento deseados, etc (APA, 2014; Bachrach, Erwin & Mohr, 1965; Bhanji & Thompson, 1974; Blinder, Freeman, & Stunkard, 1970; Halmi, Powers, & Cunningham, 1975). Es relevante destacar que estos programas de contingencias tienen efectividad únicamente a corto plazo (Agras, 1987) y esta no varía cuando los programas no son tan severos en sus restricciones (Nusbaum & Drever, 1990; Touyz, Beumont, Glaun, Phillips, & Cowie, 1984).

Posteriormente, en los años 70 y 80, surge el último elemento que configurará la concepción multidimensional actual: los aspectos sociales y culturales. Estos cobran una gran importancia y se estudia su influencia en la expresión y fenomenología del trastorno, sugiriendo como factores de riesgo la presión que sufren las mujeres en la sociedad para acomodarse al ideal de delgadez imperante y las expectativas de logro (Garfinkel & Garner, 1982; Garner & Garfinkel, 1979).

En resumen y de acuerdo con esta nueva perspectiva, la predisposición, desencadenamiento y mantenimiento de la anorexia nerviosa está relacionada con diferentes factores, a saber, somáticos, psicológicos y sociales, y, por lo tanto, su tratamiento también debe ser multifacético, abordando cada uno de los componentes. Si bien diversos autores consideran que la etiqueta multidisciplinar solo hace referencia al escaso conocimiento de los mecanismos responsables del trastorno, pues no se sabe si los diferentes factores son causa, precipitantes o resultado de la propia enfermedad (Beumont, 1998; Fetissov et al., 2008).

Así, la Asociación Americana de Psicología publicó en el año 2006 la tercera edición de la *Practice Guideline for the treatment of patients with eating disorders*, que recoge y estandariza las directrices para el tratamiento de los trastornos de la alimentación, entre ellos el

de la anorexia nerviosa, en la actualidad. Para ello realizan una revisión de la eficacia de todos los tratamientos disponibles en la literatura. En el año 2012 y con la inminente publicación del DSM-V en el año 2013, se realizó la última actualización, si bien la versión de 2006 no sufrió modificación alguna (Yager et al., 2014). Así, en el tratamiento de la anorexia nerviosa se hace referencia a la rehabilitación nutricional, tratamientos psicosociales y farmacológicos, además de la diversidad de recursos asistenciales y la involucración de diferentes especialistas en diferentes etapas de la enfermedad (Attia & Walsh, 2009).

Pero este planteamiento multidisciplinar no está exento de inconvenientes, inherentes a la propia multidimensionalidad y que también afectan al tratamiento, como son la falta de especificidad y la dificultad para distinguir la contribución de los diferentes elementos y el peso de la interacción de estos (Campbell, 1995). Además, sus efectos sólo se han demostrado eficaces a corto plazo (APA, 2006; Attia & Walsh, 2009), la tasa de recaída es cercana al 50% (Attia & Walsh, 2009; Halmi et al., 2005) e incluso algunos autores ponen en duda la pertinencia del ingreso hospitalario considerando más efectivo el tratamiento ambulatorio (Byford et al., 2007; Gowers, Weetman, Shore, Hossain, & Elvins, 2000; Gowers et al., 2007).

1.5. LOS TRATAMIENTO PSICOSOCIALES Y FARMACOLÓGICOS EN LA ACTUALIDAD (TRATAMIENTOS BASADOS EN LA EVIDENCIA)

En el año 2005 el Profesor Fairburn publicó un artículo en el cual se hacía la siguiente pregunta: “*Is evidence-based treatment of anorexia nervosa posible?*” (Fairburn, 2005). Su respuesta, “*barely*” (apenas), hasta puede ser considerado optimista teniendo en cuenta las conclusiones extraídas de las revisiones realizadas por aquel entonces (Bulik, Berkman, Brownley, Sedway, & Lohr, 2007; Crow, Mitchell, Roerig, & Steffen, 2009), en las que ningún tratamiento ni psicológico ni farmacológico fue considerado efectivo.

Casi 15 años después, el panorama referido a la eficacia de los tratamientos de la anorexia nerviosa sigue siendo el mismo. Si bien parece que ha aumentado la producción y la calidad de la evidencia para los tratamientos de la anorexia nerviosa, nuevamente, ningún tratamiento psicológico o farmacológico se mostró superior en relación con el restablecimiento del peso o la mejora de la sintomatología relacionada con el trastorno (APA, 2014; Brockmeyer, Frederich & Schmidt, 2018; Davis & Attia, 2017; Flament, Bissada & Spettigue, 2012; Frank & Shott, 2016; Miniati et al., 2016; Watson & Bulik, 2013; Zeeck et al., 2018; Zipfel et al., 2015).

1.5.1. Tratamientos psicosociales

La psicoterapia es considerada la intervención principal para el tratamiento de la anorexia nerviosa (Herpertz-Dahlmann, van Elburg, Castro-Fornieles, & Schmidt, 2015; Treasure et al., 2015; Zipfel et al., 2015) cuyos enfoques terapéuticos abarcan todo el espectro teórico (Gutiérrez & Carrera, 2014). Los tratamientos recomendados hasta el momento aparecen descritos de forma breve en la Tabla 2, e incluyen: la terapia familiar, *Specialist Supportive Clinical Management* (SSCM), *Maudsley Model of anorexia nerviosa Treatment for Adults* (MANTRA), terapia cognitivo-conductual (TCC) y la terapia focal psicodinámica (FPT), los cuales son comparados con el “*treatment as usual*” (TAU).

Mientras la terapia familiar parece haber demostrado su eficacia en la reducción de los síntomas y es el tratamiento de elección para pacientes adolescentes, en el caso de pacientes

adultos es la terapia individual la terapia de elección, a pesar de no existir evidencia de que algún tratamiento se haya mostrado superior a otro en la mejora del peso corporal, en la reducción de síntomas, del estrés o del deterioro clínico general (Brockmeyer et al., 2018; Zeeck et al., 2018; Zipfel et al., 2015). De hecho, es de especial importancia resaltar el estudio de McIntosh et al., (2005), en el que se comparó un programa de tratamiento concebido como un placebo, “*Nonspecific Supportive Clinical Management*”, con otros dos tratamientos manualizados y especializados, la terapia cognitivo-conductual y la psicoterapia interpersonal. Contrariamente a lo esperado, el grupo que recibió el tratamiento placebo obtuvo mejores resultados que los que recibieron los otros dos tratamientos especializados, haciendo que sus autores rebautizaran el programa como “*Specialist Supportive Clinical Management*” (SSCM). Hasta la fecha, el SSCM se ha mostrado más o igual de eficaz que el resto de los tratamientos estandarizados (Zipfel et al., 2014).

Por otro lado, el tratamiento ambulatorio no se mostró menos eficaz que el hospitalario (Herpertz-Dahlmann, Konrad, Timmesfeld, & Dempfle, 2014; Madden et al., 2015), por lo que las guías de práctica internacionales recomiendan el ingreso hospitalario cuando la anorexia nerviosa es más severa o cuando no responden al tratamiento ambulatorio (APA, 2014). Debido a las altas tasas de recaída tras la finalización del tratamiento (Attia & Walsh, 2009; DeJong, Broadbent, & Schmidt, 2012; Halmi, 2009) se han empleado de forma adjunta tratamientos para evitar esta cuestión y mejorar el cuidado postratamiento. Así, aunque la evidencia es escasa, las pacientes tratadas con terapia cognitivo conductual tienen menos recaídas y tardan más en sufrirlas durante el primer año después del alta hospitalaria en comparación con aquellas que no han recibido ningún tipo de intervención (Carter et al., 2009; Fichter et al., 2012; Pike, Walsh, Vitousek, Wilson, & Bauer, 2003).

Con el aumento de la investigación en los circuitos neuronales implicados en la anorexia nerviosa, han surgido una serie de tratamientos altamente específicos basados en estos mecanismos neurobiológicos (terapia de remediación cognitiva, terapia basada en la exposición o tratamientos de neuromodulación cerebral) pero todavía no existe mucha evidencia empírica al respecto (Brockmeyer et al., 2018).

También cabe destacar que debido a la gran carga que supone cuidar de una paciente con anorexia nerviosa y el riesgo que corren estos cuidadores de desarrollar una enfermedad mental (Kyriacou, Treasure, & Schmidt, 2008; Zabala, Macdonald, & Treasure, 2009), actualmente también se han desarrollado tratamientos enfocados en estas personas. Además de para mejorar su propia salud, las conductas de los cuidadores podrían influir en el mantenimiento de la enfermedad por lo que actuando sobre ellas se podría obtener mejores resultados clínicos en las pacientes (Zipfel et al., 2015), aunque nuevamente no existe suficiente evidencia empírica al respecto (Spencer et al., 2018).

Tratamientos psicosociales

Terapia familiar	Specialist supportive clinical management (SSCM)
<p>El tratamiento familiar es un tratamiento de tres fases para pacientes adolescentes con anorexia nerviosa y sus familias durante 16 sesiones de 1 hora y un período de 9 meses (inicialmente de 10 horas durante 6 meses).</p> <ul style="list-style-type: none"> • En la primera fase, la terapia se caracteriza por intentar absolver a los padres de la responsabilidad de causar el trastorno y felicitarlos por los aspectos positivos de su crianza. Se alentó a las familias a buscar por sí mismas la mejor manera de ayudar a recuperar el peso de su hijo con anorexia nerviosa. • En la fase 2, se ayudó a los padres a hacer la transición de la alimentación y el control de peso al adolescente de una manera apropiada para su edad. • La tercera fase se centró en establecer una relación sana entre el adolescente y los padres. Se brindaron 24 sesiones de 1 hora durante el período de 1 año <p>(Lock et al., 2010 y Agras et al., 2014; apéndice).</p>	<p>Este tratamiento debe ser administrado por terapeutas especializados en el tratamiento de trastornos de la alimentación y debe proporcionar una forma habitual y estandarizada de tratamiento ambulatorio. Los pacientes con anorexia nerviosa y un IMC de 15 kg/m² o menos reciben hasta 30 sesiones de terapia individuales una vez por semana y cuatro sesiones de seguimiento mensuales. En aquellos pacientes con un IMC > 15 kg/m², el número de sesiones podría reducirse a 20. Combina el manejo clínico (es decir, proporcionar información, asesoramiento y estímulo) con un estilo terapéutico de apoyo diseñado para establecer una relación terapéutica positiva y fomentar el cambio. El contenido de la terapia incluye evaluación, identificación y revisión regular de los síntomas objetivo; psicoeducación y seguimiento del estado físico; establecimiento de un rango de peso objetivo; y educación y asesoramiento nutricional. El objetivo es ayudar a los pacientes a establecer un vínculo entre sus síntomas clínicos y su comportamiento alimentario anormal y su peso, y ayudar a los pacientes a regresar gradualmente a su comportamiento y peso normales. El paciente determina el contenido adicional de la terapia (McIntosh et al., 2006; apéndice)</p>
Terapia focal psicodinámica	Terapia cognitivo-conductual (TCC-M)
<p>El tratamiento inicial manualizado se diseñó como una psicoterapia psicodinámica ambulatoria de 40h para pacientes moderadamente enfermos con anorexia nerviosa (IMC > 15 kg/m²). Al comienzo de la terapia psicodinámica focal, el terapeuta identifica focos psicodinámicos relevantes mediante una entrevista diagnóstica psicodinámica estandarizada y operacional (OPD-II).</p> <p>El manual de tratamiento psicodinámico se puede dividir aproximadamente en tres fases de tratamiento. La primera fase se enfoca principalmente en la alianza terapéutica, el comportamiento pro-anoréxico y las creencias egosintónicas (las actitudes y el comportamiento que se consideran aceptables) y la autoestima. En la segunda fase del tratamiento, se enfoca principalmente en las relaciones relevantes y la asociación entre las relaciones interpersonales y el comportamiento alimentario (anoréxico). Los aspectos pertinentes de la fase final son la transferencia a la vida cotidiana, la anticipación de la finalización del tratamiento y la separación. Antes de cada sesión de tratamiento, se evalúa y documenta el peso del paciente (Friederich et al., 2014).</p>	<p>Según Fairburn y sus colegas, la TCC-M es la abreviatura de "terapia cognitiva-conductual mejorada" y se refiere a un tratamiento psicológico personalizado "transdiagnóstico" para los trastornos de la alimentación. Fue desarrollado como un tratamiento ambulatorio para adultos, pero es una versión intensiva para pacientes hospitalizados y en hospitales de día ambulatorios, y una versión para personas más jóvenes. Como tratamiento ambulatorio, el tratamiento TCC-M tiene cuatro etapas y está disponible en versión corta (20 sesiones) y larga (40 sesiones). En la etapa uno, el enfoque está en obtener una comprensión mutua del problema alimentario de la persona y ayudarlo a modificar y estabilizar su patrón de alimentación. En la breve segunda etapa, el progreso se revisa sistemáticamente y se hacen planes para el cuerpo principal de tratamiento. La tercera etapa se centró en los procesos que mantienen el problema de alimentación de la persona (por ejemplo, abordar las preocupaciones sobre la forma y la alimentación). En la última etapa, el énfasis se desplaza hacia el futuro. Hay un enfoque para lidiar con los contratiempos y mantener los cambios que se han obtenido (Fairburn, 2008; apéndice).</p>

Tabla 2. Principales tratamientos psicosociales recomendados para el tratamiento de la anorexia nerviosa. Extraído y traducido de Zipfel et al, 2015. Con permiso de Elsevier.

Tratamientos psicosociales (continuación)

Maudsley model of anorexia treatment for adults (MANTRA)

Este tratamiento es un tratamiento cognitivo-interpersonal de base empírica, que propone que cuatro factores generales, relacionados con los rasgos de personalidad obsesivos y ansiosos (o evitantes) subyacentes, son fundamentales para el mantenimiento de la anorexia nerviosa. Estos son (1) un estilo de pensamiento caracterizado por la inflexibilidad, la excesiva atención a los detalles y el miedo a cometer errores; (2) deficiencias en el dominio socioemocional (por ejemplo, evitar la experiencia emocional, la regulación y la expresión); (3) creencias positivas sobre cómo la anorexia nerviosa ayuda a la persona en su vida; y (4) respuestas inútiles de otras personas cercanas (por ejemplo, compromiso excesivo, crítica, adaptación a los síntomas). Estos factores se enfocan en el tratamiento con el objetivo de mejorar el peso, el trastorno alimentario y otros síntomas, y el ajuste psicosocial. El estilo de tratamiento es motivacional. El tratamiento se centra en un manual del paciente. Este manual tiene módulos básicos (p. Ej., Formulación) y módulos opcionales (p. Ej., Módulo sobre la creación de una identidad llamada no anoréxica).

El tratamiento tiene una estructura clara y una jerarquía de procedimientos terapéuticos. La adaptación individual del tratamiento surge de la flexibilidad de cómo se combinan los módulos y de cuánto énfasis se les da a la nutrición y otros síntomas.

El manejo o el cambio de comportamiento, la información o el consejo se dan si el paciente está preparado para ello con motivación. Las diferencias con otros tratamientos incluyen que el modelo se desarrolló específicamente para la anorexia nerviosa, se basa en investigaciones biológicas y psicológicas y se adapta a los rasgos característicos de este trastorno. Es único en su uso de un libro de ejercicios para pacientes, desarrollado en coproducción con pacientes y terapeutas. También es único en su participación de cuidadores tanto en el modelo o formulación como en el tratamiento. Se dispone de materiales de cuidadores separados según el modelo (Schmidt et al., 2015; apéndice).

Tabla 2 (Continuación). Principales tratamientos psicosociales recomendados para el tratamiento de la anorexia nerviosa. Extraído y traducido de Zipfel et al, 2015. Con permiso de Elsevier

1.5.2. Tratamientos farmacológicos

La superposición entre los trastornos de alimentación y otras condiciones psiquiátricas como la depresión mayor, el trastorno por ansiedad generalizada o el trastorno obsesivo compulsivo, ha favorecido el interés por el estudio de la posible eficacia de diferentes medicaciones psicotrópicas en el tratamiento de los trastornos de alimentación. Mientras que el uso de antidepresivos en la bulimia nerviosa se ha mostrado efectivo convirtiéndose en el tratamiento farmacológico indicado para este trastorno, en el caso de la anorexia nerviosa la situación es completamente distinta, por lo que no existe ningún fármaco eficaz para su tratamiento (Davis & Attia, 2017; Flament et al., 2012; Frank & Shott, 2016; Miniati et al., 2016).

Los primeros autores que estudiaron el empleo de fármacos psicotrópicos en el tratamiento de la anorexia nerviosa fueron Dally, Oppenheim & Sargant en 1958. Sargant, contrario a continuar realizando leucotomías a pacientes con anorexia nerviosa y debido al fracaso conseguido con el uso de insulina para conseguir restablecer el peso corporal, propuso la combinación de insulina y clorpromazina, un antipsicótico típico, a dosis elevadas. Así, tras el empleo de este combinado junto con psicoterapia de apoyo y reposo en cama (para evitar posibles fracturas óseas a causa de la hipotensión que producía la medicación), informan de mejoras con respecto a la ganancia de peso, la reducción del tiempo de ingreso y de las recaídas postratamiento. Pero estas diferencias no llegaron a ser lo suficientemente significativas con respecto a un grupo de pacientes que recibió el mismo tratamiento a excepción de la clorpromazina y además produjo graves efectos extrapiramidales en la mitad de las pacientes (Dally & Sargant, 1960, 1966).

Desde entonces, se han estudiado una gran variedad de principios activos en el tratamiento de la anorexia nerviosa: antidepresivos tricíclicos (clomipramine, amitriptyline), inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (fluoxetina, citalopram, mirtazapine), antipsicóticos de primera generación o típicos (haloperidol, clorpromacina, sulpiride, pimozide, amisulpiride, benzamide) y de segunda generación o atípicos (olanzapina, quetiapine), estabilizadores del ánimo como el litio, antihistamínicos (ciproheptadine), zinc, opiáceos y cannabinoides (naloxona, naltrexona, dronabinol) y benzodicepinas (alprazolam, clonidine). Algunos de estos fármacos parecen tener algún beneficio sobre la ganancia de peso y la sintomatología de la anorexia nerviosa, aunque sus efectos son más bien marginales y en otros casos, como los antidepresivos tricíclicos, los antipsicóticos típicos, el litio y los opiáceos, sus efectos adversos desautorizan su uso⁵. La olanzapina es el compuesto que más atención ha recibido por parte de los investigadores, ya que en un principio parecía mostrar mejoras significativas en el peso corporal y otros síntomas con la somnolencia como único efecto adverso. Pero con el aumento de la investigación las controversias también alcanzaron a este antipsicótico de segunda generación, por lo que las evidencias con respecto a su supuesta eficacia quedaron diluidas y actualmente, aunque las distintas revisiones hagan hincapié en que podría resultar útil, no ha mostrado una efectividad real (Davis & Attia, 2017; Flament et al., 2012; Frank & Shott, 2016; Miniati et al., 2016).

Además de estos compuestos, se han desarrollado estudios con nuevos agentes terapéuticos como la grelina, estrógenos, hormonas del crecimiento o agonistas de NMDA glutamatergicos d-cicloserina, que de momento han reportado las mismas conclusiones que los compuestos tradicionales (Frank & Shott, 2016).

Algunos de los problemas que podrían estar detrás de esta ausencia de evidencia en la eficacia de los tratamientos farmacológicos de la anorexia nerviosa son compartidos con los tratamientos psicosociales: el escaso número de pacientes, las tasas de recaídas y abandono del tratamiento, grupos control inadecuados, etc. Pero, además, Himmerich et al., (2018) ponen de manifiesto que el abandono de los estudios farmacológicos por parte de las pacientes se debe a la percepción que estas y sus familiares tienen de que los fármacos no van a mejorar sus síntomas y la preocupación de que como efecto secundario aumenten de peso. Pero por el contrario si consideran que la medicación es efectiva para reducir la depresión y la ansiedad⁶. Pese a estos problemas, es importante resaltar que el uso de las diferentes medicaciones en la psiquiatría en general, no son resultado de una base sistemática y empírica ya que todavía falta conocimiento sobre la fisiopatología específica de los trastornos, y por tanto son producto de la serendipia (Ban, 2006).

A pesar de esta ausencia generalizada de eficacia documentada y la no recomendación por parte de las guías de práctica clínica, una gran proporción de pacientes con anorexia

⁵ En el caso de los antidepresivos tricíclicos, estos producen una fatal arritmia cuando las pacientes tienen un peso muy bajo, especialmente si son jóvenes. La clorpromacina, como ya hemos descrito anteriormente, produce graves efectos extrapiramidales, y además otros antipsicóticos típicos pueden producir discinesia tardía e inducción de Parkinson. El litio al ser sensible a cambios en los niveles de fluidos corporales, ante una situación de restricción de fluidos puede producir toxicidad. Por último, los opiáceos producen disforia y problemas de sueño. Además, el dronabinol produjo un aumento de la hiperactividad que provocó que el gasto energético de las pacientes aumentase (Andries, Gram, & Støving, 2015).

⁶ En respuesta a reducir estas tasas de abandono proponen incluir medidas de resultado y experiencia informadas por los pacientes en los ensayos controlados aleatoriamente que les permita evaluar la efectividad, seguridad y las experiencias de cuidado de estos ensayos. Además, hacer a las pacientes y a sus familiares partícipes en la priorización y diseño de los ensayos ayudaría a mejorar su calidad. Miniati & Marazziti (2017) además proponen una “evaluación del espectro” de la anorexia nerviosa previa al ensayo que permitiría evaluar y comprender mejor el curso de la sintomatología y resaltar aquellos signos y síntomas que los pacientes consideran relevantes según su experiencia subjetiva.

nerviosa son tratadas con medicación psicotrópica (APA, 2014; Casper, 2002; Monge et al., 2015).

1.5.3. Conclusiones con respecto a los tratamientos disponibles para la anorexia nerviosa

Lamentablemente, la conclusión que se puede extraer con respecto a los diferentes tipos de tratamiento disponibles para la anorexia nerviosa es que no existe ningún tratamiento eficaz. A pesar de ello, no deja de recomendarse un enfoque multidisciplinar de tratamiento, tal y como recogen las guías de práctica internacionales: “*it is important to consider a patient’s overall physical condition, psychology, behaviors and social circumstances when choosing a treatment setting*” (APA, 2014, p. 3).

Otros autores, por el contrario, ponen de relieve el problema que supone focalizar el tratamiento en el peso y las conductas relacionadas con la comida, ya que no generan grandes resultados porque es un objetivo que persigue el terapeuta y no la paciente, además de ser una diana equivocada, engañosa y dañina (Lask & Frampton, 2009; Miniati & Marazziti, 2017; Zeeck et al., 2018).

Ante la desalentadora situación de los tratamientos de la anorexia nerviosa no resulta descabellado pensar que sea una consecuencia directa de la conceptualización del trastorno o un error a la hora de trasladar lo que expone determinada teoría a la protocolarización de los tratamientos (Gutiérrez & Carrera, 2014). Esta idea se ve reforzada, en primer lugar, por la historia misma del trastorno. Como hemos revisado, la conceptualización del trastorno ha ido transformándose a lo largo de los años desde diferentes enfoques (médico, psicológico, multidisciplinar) sin obtener ningún beneficio en relación con los tratamientos que se han propuesto (Halmi, 2009). Y, en segundo lugar, el hecho de que un tratamiento no-específico y concebido como un placebo que no está basado en ninguna teoría (SSCM), resulte igual de efectivo o más que un tratamiento estructurado y creado con un propósito específico (MANTRA), pone de relieve la inutilidad de dichos componentes específicos (Gutiérrez & Carrera, 2014).

Actualmente, la conceptualización de la anorexia nerviosa vigente y que lleva dominando durante los últimos 60 años, es la desarrollada por Hilde Bruch, que resalta el papel central de las distorsiones de la imagen corporal (Bruch, 1962, 1970a, 1982), y cuyo desarrollo de tratamientos no ha sido satisfactorio. Por ello, es vital hacer una revisión crítica de que esta suposición teórica podría ser errónea. De hecho, este concepto parece estar más presente en la mente de los terapeutas y las hipótesis de investigación que en la mente de las pacientes, convirtiéndose en un producto de la aculturización a través de la terapia y los medios de comunicación (Gutiérrez & Carrera, 2016)⁷.

Por lo tanto, el futuro en el desarrollo de tratamientos para la anorexia nerviosa debería explorar nuevas rutas de conceptualización ya que parece que nos movemos por el camino equivocado (Gutiérrez & Carrera, 2018). Una opción útil es recurrir a los modelos análogos de la anorexia nerviosa, tales como el de Anorexia Basada en la Actividad (ABA) o de Hiperactividad Inducida por Semi-inanición (SIH), ya que nos permite categorizar la anorexia

⁷ Esta idea se desprende de un estudio realizado por Woodside & Twose (2004), en el que pacientes chinas con anorexia nerviosa abandonaban su razonamiento original para dejar de comer por el de “miedo a engordar” impuesto en la terapia.

nerviosa y generar nuevas hipótesis alternativas para mejorar el tratamiento y comprensión de este trastorno (Gutierrez, 2013).

2. EL USO DE MODELOS ANIMALES EN LOS TRASTORNOS PSIQUIÁTRICOS Y EN LA ANOREXIA NERVIOSA

El uso de modelos animales y su validez traslacional es comúnmente aceptada en la ciencia biomédica, sin embargo, en el ámbito de los trastornos mentales resulta menos habitual. La razón de esta escasa utilización estriba en que prácticamente la mayoría de los trastornos psiquiátricos carecen de signos siendo su diagnóstico realizado a partir de síntomas⁸. Aun así, la anorexia nerviosa no es el único trastorno psiquiátrico que dispone de un modelo animal, sino que otros trastornos como la depresión, la ansiedad e incluso la esquizofrenia, también se benefician de la utilización de modelos animales en el ámbito de la investigación y desarrollo de tratamientos (Baker, 2011). Gracias a los grandes avances técnicos y metodológicos, unido a las restricciones éticas de la investigación con humanos, han propiciado que actualmente exista una gran variedad de modelos animales en el ámbito psiquiátrico.

Aunque las causas de algunas enfermedades no siempre pueden caracterizarse a través de un modelo animal, esta es una herramienta útil para la comprensión de la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento. Los diferentes modelos animales pueden clasificarse de diferentes formas y en la anorexia nerviosa generalmente se pueden dividir en dos categorías, los modelos genéticos y los modelos ambientales (Siegfried, Berry, Hao, & Avraham, 2003).

Los modelos genéticos han generado una gran cantidad de genes relevantes a la hora de regular la ingesta de alimentos y el balance energético, por lo que estos pueden estar presentes en las vías potenciales que contribuyen a la etiología y mantenimiento de la anorexia nerviosa (Kim, 2012). Aunque las mutaciones genéticas generalmente resultan en fenotipos de obesidad, existe el ratón *anx/anx*, que es el único roedor que se puede considerar espontáneamente anoréxico (Maltais, Lane, & Beamer, 1984; Nilsson, 2019).

Por otro lado, los modelos ambientales implican la manipulación del entorno del animal. Así, dentro de esta categoría podemos encontrarnos con modelos de restricción de la dieta y modelos de estrés (Kim, 2012). En los modelos de restricción de comida, como su propio nombre indica, consiste únicamente en restringir el alimento de los animales, lo que produce cambios en el sistema neuroendocrino similares a los observados en las pacientes con anorexia nerviosa, y también exhiben una función cognitiva reducida cuando la restricción es crónica (Campbell & Bedi, 1989; Idrobo, Nandy, Mostofsky, Blatt, & Nandy, 1987). En cambio, los modelos de estrés no requieren la manipulación de la ingesta, sino que los animales son sometidos a una fuente de estrés que induce la reducción de la ingesta y el peso corporal. Los diversos factores estresantes incluyen pinchazos en la cola, baños en agua fría (Shimizu, Oomura, & Kai, 1989) o estimulación cerebral a través de una inyección o estimulación

⁸ Los signos son las manifestaciones objetivas, clínicamente fiables, y observables para cuya evaluación no se necesita del informe del paciente, a diferencia de los síntomas, cuya evaluación sólo puede realizarse a partir de la perspectiva subjetiva del paciente.

eléctrica (Marrazzi et al., 1990; Smith, 1989), lo que pueden producir lesiones físicas en los animales. Por eso, recientemente se han desarrollados formas más leves de estrés como el aislamiento físico o la introducción del animal en un entorno al que no había sido previamente expuesto (Saegusa et al., 2011).

Sin embargo, los modelos animales más ampliamente utilizados en la investigación de la anorexia nerviosa son un modelo de estrés que tienen como característica común una observación muy antigua en los primeros laboratorios experimentales de psicología en los que se utilizaba la privación de comida para aumentar la motivación de los animales (ratas fundamentalmente) para la colaboración en los protocolos experimentales. También, en conexión con esta forma de proceder se ha registrado desde principios del siglo XX (Finger, 1951; Hall & Hanford, 1954; Richardson, 1939; Richter, 1992; Siegel & Steinberg, 1949; Spear & Hill, 1962) como las ratas alimentadas con una sola comida diaria aumentaron progresivamente su actividad en la rueda y como resultado de esta actividad progresiva los animales finalmente dejan de comer y se producía una gran mortandad. A continuación, pasaremos revista a los dos modelos que mejor representan la investigación centrada en la hiperactividad mostrada por animales sometidos a restricción de comida en un entorno experimental en el que los animales tienen libre acceso a la rueda de actividad: El modelo de ‘Anorexia basada en la actividad’ (ABA, siglas de la denominación original *Activity-Based Anorexia*), y el modelo de ‘Hiperactividad inducida por semi-inanición’ (SIH de la denominación original *Semistarvation induced Hyperactivity*).

3. HIPERACTIVIDAD EN ANIMALES SOMETIDOS A PROGRAMAS DE RESTRICCIÓN DE COMIDA

Como ocurre con todos los modelos animales en el estudio de los trastornos mentales, ningún modelo animal puede aspirar a ser una representación exacta del conjunto de signos y síntomas de la anorexia nerviosa. Esto es así ya que la propia perspectiva teórica actual de la anorexia nerviosa, como ya hemos visto, se fundamenta en una interacción compleja entre genética, ambiente, y factores socioculturales, y estos últimos no pueden ser reproducidos por un modelo animal, ya que una rata no dispone de las capacidades cognitivas y de simbolización necesarios (Gutierrez, 2013).

Históricamente, la utilización de modelos animales en el estudio de la anorexia nerviosa ha tenido detractores que señalan que: “*It is not possible to use animal data to learn about the attitudinal dimensions, in part related to societal ideals, of the excessive concern with body weight and shape, that are so characteristic of human eating disorders*” (Coscina & Garfinkel, 1991, p. 238).

Aun así, no debemos descartar la importancia del uso de modelos animales para abordar aquellas características del trastorno que sí son reproducibles. De hecho, el modelo ABA supone la mejor representación de lo que significa un modelo análogo a un trastorno mental porque reproduce los signos básicos de la anorexia nerviosa en humanos, tales como la pérdida de peso, la alimentación restrictiva y la hiperactividad (Gutierrez, 2013; Siegfried et al., 2003),

permitiendo una mejor comprensión de la interacción entre la dieta y el ejercicio físico, además de otras manifestaciones clínicas.

3.1. EL MODELO ABA

El modelo ABA es considerado no solo como el mejor modelo animal de la anorexia nerviosa, sino el mejor modelo animal análogo de cualquier trastorno mental (Casper, Sullivan, & Tecott, 2008; Gutierrez, 2013; Klein & Walsh, 2005).

El modelo ABA se formalizó a partir de la descripción del fenómeno de la "auto-inanición" (traducción del término *self-starvation* en inglés), por Routtenberg & Kusnesof, (1967) a partir de sus estudios con ratas intactas en ruedas de actividad sometidas a un horario de alimentación restringido. Como se esperaba de informes anteriores en la literatura (Finger, 1951; Hall & Hanford, 1954; Richter, 1992; Siegel & Steinberg, 1949; Spear & Hill, 1962), las ratas alimentadas con una sola comida diaria aumentaron progresivamente su actividad en la rueda y como resultado de esta actividad progresiva los animales finalmente dejan de comer y mueren de inanición. Aunque la pérdida de peso es comprensible con el cambio repentino de la alimentación ad libitum al programa restringido, lo que parece paradójico es la incapacidad para adaptar la ingesta al coste del ejercicio progresivo, lo que finalmente conduce a la auto-inanición de los animales, cuya actividad en la rueda sobrepasa los diez kilómetros de actividad al día.

Al año siguiente de la publicación de Routtenberg & Kusnesoff (1967), el profesor Carl Cheney, decide replicar su estudio con la ayuda de un estudiante universitario, Frank Epling, reproduciendo los mismos resultados. Esta línea de investigación parecía paralizada, hasta que doce años después, el mismo Epling retomó estos estudios junto con David Pierce, tras la publicación de un artículo de revisión en el que se ponía de relieve la presencia de hiperactividad en pacientes con anorexia nerviosa, otorgándole relevancia clínica por primera vez en la literatura (Kron, Katz, Gorzynski, & Weiner, 1978). Con este artículo en mente, Epling y Pierce relacionan el aumento de la actividad en la rueda y la ingesta reducida en las ratas sometidas a un programa de restricción alimentaria con la hiperactividad y restricción de alimentos típica de la anorexia nerviosa, sugiriendo que estos dos aspectos son los mayores determinantes de la anorexia en humanos, al mismo tiempo que proponen un posible modelo animal para este trastorno (Epling & Pierce, 1988; Epling, Pierce, & Stefan, 1983; Pierce & Epling, 1991).

De hecho, en el año 1983 publican el artículo "*A theory of Activity-Based Anorexia*", en el que proponen una nueva concepción de la anorexia nerviosa que se basaba en dos premisas principales:

- a) Que la mayor parte de los casos diagnosticados de anorexia nerviosa en realidad son casos de anorexia por actividad, haciendo una estimación del 75%. (p. 27).

- b) Que la mayoría de los síntomas psicológicos de la anorexia nerviosa son resultado del estado de inanición (p. 43)⁹.

Así, el modelo ABA se presenta como un modelo análogo de la anorexia nerviosa en el cómo Epling & Pierce argumentan en su libro “*Solving the Anorexia puzzle*” (1991), la etiqueta “nerviosa” que acompaña al de anorexia significaría un diagnóstico erróneo, y debería considerarse mejor como un caso de Anorexia por Actividad (AA)¹⁰. Así, para Epling & Pierce las consecuencias de la exposición de los animales al modelo ABA coincidiría con la secuencia y el curso de la anorexia nerviosa de muchos humanos, donde la dieta, el ejercicio y la inanición son los elementos que se cierran sobre sí mismos en un circuito de retroalimentación positiva. Además, estos autores se oponen a la concepción tradicional de los factores psicosociales como causa del trastorno, y hasta su calificación como trastorno mental: “*Activity anorexia is not a mental or psychological disorder*” (Epling & Pierce, 1991, p.3), siendo los trastornos de la imagen corporal, supuestamente una psicopatología característica de la anorexia nerviosa, el resultado de la inanición y no su causa (Bergh & Södersten, 1998). Este cambio conceptual se representa esquemáticamente en la Figura 1.

Si bien a partir de esta publicación, el modelo ABA se convierte en un modelo análogo de la anorexia nerviosa, es importante hacer mención a una línea de investigación previa al modelo ABA; la de “úlceras de estrés por actividad” (AS) (Paré & Houser, 1973), que tiene su origen en un estudio en el que animales también expuestos a restricción de alimento y rueda de actividad presentaban, en el análisis post-mortem, lesiones extensas en el estómago, las cuales podrían ser las responsables de la auto-inanición de los animales (Barboriak, Wilson, Schulte, & Knoblock, 1972). Este modelo AS también surge de las investigaciones de Routtenberg & Kuznesof (1967) y su relevancia con respecto al modelo ABA radica en el criterio de pérdida de peso que se utiliza para retirar a los animales de cada uno de los procedimientos y evitar el sufrimiento y muerte del animal. Así, mientras en el modelo ABA los animales son retirados del procedimiento cuando alcanzan el 25% de pérdida de peso, en el modelo AS ocurre cuando alcanzan el 30% debido a que las úlceras estomacales no son evidentes por debajo de dicho porcentaje (Doerries, Stanley, & Aravich, 1991). Por lo tanto, el criterio de pérdida de peso del 25% es apropiado para asegurar que la reducción en la ingesta no se deba a estas úlceras estomacales (Gutiérrez, 2013).

⁹ Esta premisa está fuertemente basada en los resultados obtenidos en el estudio de Ancel Keys que hemos descrito anteriormente (Keys et al., 1950).

¹⁰ Al igual que el término “anorexia” no se refiere a la pérdida de apetito en los pacientes humanos con Anorexia nerviosa, el término en el modelo animal se refiere a la ingesta reducida durante la alimentación restringida, en comparación con los animales del grupo de control expuestos al mismo programa de alimentación restringido sin acceso a una rueda de actividad. Esta diferencia en la eficiencia de la ingesta desafía el sentido común ya que sería esperable una mayor ingesta en los animales que despliegan una excesiva actividad en la rueda. Así pues, la denominación ABA destaca el papel funcional de la actividad en el estancamiento de la ingesta por debajo de la ingesta de los animales del grupo de control: “por lo que la ingesta puede considerarse *suprimida* en esos animales (Epling & Pierce, 1984).

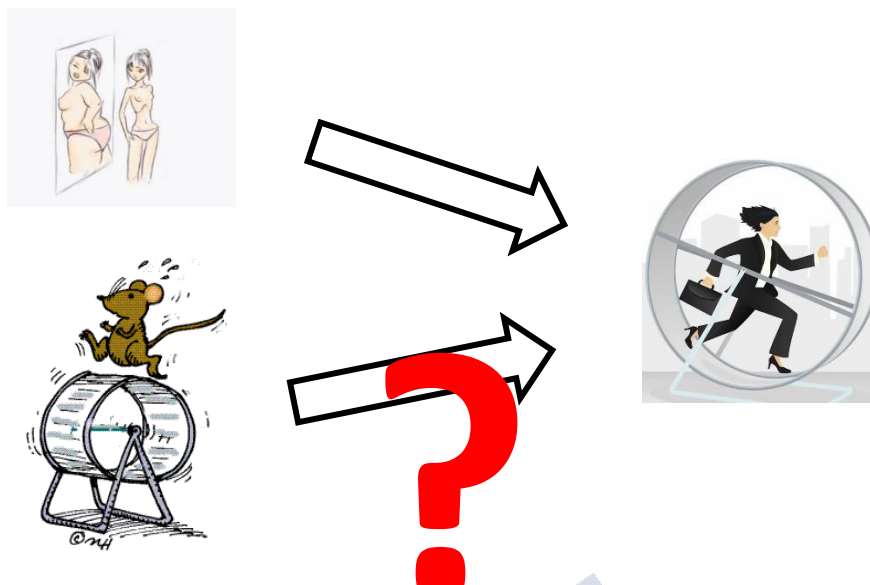


Figura 1. Alternativa del modelo análogo ABA del comportamiento hiperactivo en la anorexia nerviosa.

3.1.1. Descripción y particularidades del modelo ABA

Con la denominación de Anorexia Basada en la Actividad (ABA), Epling & Pierce (1983, 1988) hacían hincapié en un fenómeno que es fácilmente observable y reproducible en la investigación con animales de laboratorio. Aunque ya hemos apuntado de forma superficial en qué consiste el modelo ABA, a continuación, haremos una descripción más detallada del procedimiento y sus consecuencias. Así, es pertinente resaltar que la designación ABA hace referencia a dos aspectos: al resultado final, es decir, al hecho de que al final del procedimiento los animales han desarrollado anorexia por actividad, y al procedimiento en sí de exponer a los animales de forma simultánea a un programa de alimentación restringida (1.5 h/día) y libre acceso a rueda de actividad (23.5 h/día).

Es importante resaltar varios aspectos relacionados con el procedimiento. En primer lugar, que las consecuencias de pérdida de peso, disminución de la ingesta y aumento de actividad en la rueda, únicamente tienen lugar si ambas condiciones de dieta y ejercicio se dan simultáneamente. Si los animales son expuestos a cada condición por separado, es decir, a programas de restricción de alimento sin acceso a rueda de actividad (Lambert, 1993; Routtenberg & Kuznesof, 1967), o a libre acceso a rueda de actividad con alimentación ad libitum (Carrera, 2007; Epling et al., 1983; Lattanzio & Eikelboom, 2003) se adaptan y sobreviven, y muestran como por separada tanto un ejercicio físico como una alimentación frugal y comedida.

Un aspecto relevante a tener en cuenta en cuanto a la triada de consecuencias en el modelo ABA es que la actividad que desarrollan los animales es voluntaria ya que no están obligados a correr en la rueda. De hecho, hasta en los animales alimentados ad libitum con acceso a una rueda de actividad se produce una reducción de la ingesta y por lo tanto del peso corporal (Afonso & Eikelboom, 2003).

Por otro lado, la cantidad de alimento que se administra a los animales es suficiente para permitir la supervivencia, ya que animales expuestos únicamente a restricción de alimento sobreviven prácticamente el cien por cien los casos. Por lo tanto, es la combinación de ambas condiciones (dieta y acceso a la rueda) lo que permite que se desarrolle ABA, aunque existe entre un 20% y un 30% de animales que no desarrollan hiperactividad cuando se enfrentan con un programa de alimentación restringida (Mondon, Dolkas, Sims & Reaven, 1985) lo que les permite adaptarse al programa de alimentación restringida y en consecuencia no pierden peso y sobreviven en estas condiciones experimentales.

Aunque las ratas expuestas al procedimiento estándar ABA pierden peso progresivamente hasta que se produce la inanición, una mirada más cercana a la secuencia de los principales cambios en la actividad, la ingesta de alimentos y la pérdida de peso revela una imagen más compleja. Con respecto al consumo de alimentos, el cambio repentino al horario de privación de 23 horas deprime severamente la ingesta de alimentos dado que el patrón de alimentación natural de las ratas consiste en visitas breves al comedero durante las horas de oscuridad, y ocasionalmente durante el período de luz. De hecho, repartir el tiempo de acceso a los alimentos de dos a cuatro períodos más cortos manteniendo el tiempo diario total constante de acceso a los alimentos, aumenta la supervivencia de los animales (Kanarek & Collier, 1983; Lambert & Peacock, 1989; Tsuda, Tanaka, Iimori, Ida, & Nagasaki, 1981).

Así pues, una vez las ratas se enfrentan a la condición de una comida diaria por un tiempo limitado, tratan de aumentar su consumo diario de alimentos de un día a otro hasta un punto en el que el consumo desciende vertiginosamente y, si no se evitase, los animales morirían sin consumir ni un solo gramo el último día. Estos cambios en la ingesta de alimentos ocurren en el contexto de un aumento progresivo de la actividad en la rueda. La actividad diaria de carrera aumenta a una velocidad rápida, primero durante el período de oscuridad del ciclo luz/oscuridad (L/D, siglas universales del inglés Light/Dark) y luego la actividad se incrementa durante la fase de luz. La actividad total (fase de luz y de oscuridad) alcanza su cenit uno o dos días después del pico máximo de consumo de alimentos. Este es un momento crítico porque mientras las ratas alcanzan su máximo de actividad en las ruedas, su ingesta diaria de alimentos comienza a disminuir. Una vez que se alcanza este punto de máxima actividad y el descenso del consumo de alimentos, la actividad disminuirá drásticamente y la muerte se producirá en 24-48 horas. A su vez, con respecto al peso corporal, las ratas muestran una gran caída inicial en el peso corporal una vez que se enfrentan al programa de alimentación restringida. Luego de una breve estabilización la pérdida de peso se acelera a medida que la alimentación y el comportamiento de la actividad evolucionaron como se acaba de describir.

Cómo hemos comentado, en un 20% de los casos los animales se adaptan a este procedimiento, por lo que Routtenberg & Kusnesof (1967) definieron un criterio de supervivencia que consistía en el que el peso corporal en el Día n debía ser superior al peso corporal de cuatro días atrás, $n - 4$. Sin embargo, para evitar el sufrimiento del animal y su muerte, establecieron un criterio de retirada del experimento basado en la ingesta, en el que se interrumpen las condiciones experimentales cuando los animales comen menos de 1 g diario durante un período de alimentación de 1 hora (Routtenberg & Kusnesof, 1967, p. 416).

Actualmente, se utiliza un criterio de retirada basado en el peso corporal y por lo tanto los animales son apartados de las condiciones de alimentación restringida y libre acceso a rueda

de actividad cuando alcanzan el 25% de la pérdida de peso con respecto al peso que tenían al inicio del experimento, denominado Día 0. Con este criterio aparte de evitar la muerte del animal, también se elimina el sufrimiento derivado de una posible ulceración.

3.1.2. Factores que afectan al desarrollo de ABA

A lo largo de la investigación con el modelo ABA se ha demostrado que existen multitud de factores que pueden proteger, aliviar o agravar el resultado final de los animales (Carrera, Fraga, Pellón, & Gutiérrez, 2014; Gutierrez, 2013; Gutiérrez & Pellón, 2002). Estos factores se pueden clasificar en las siguientes categorías:

- Características de los animales: sexo, edad, peso, actividad basal, ciclo estral en hembras, etc.
- Aspectos relacionados con el procedimiento: tiempo de privación de comida, número de comidas diarias, tipo de comida y su calidad nutritiva, tiempo de acceso a rueda de actividad.
- Aspectos pre-experimentales: pre-exposición al programa de restricción o a la rueda de actividad
- Aspectos evolutivos: experiencias de estrés previas, manipulaciones del cuidado materno, etc.
- Características ambientales: temperatura ambiental, ciclo de luz/oscuridad, condiciones de alojamiento, aislamiento sensorial, etc.

Por otro lado, también es importante destacar que el procedimiento ABA inicialmente empleaba ratas albinas, pero también se ha descrito en ratones (Klenotich & Dulawa, 2012) y en diferentes cepas de ratón y rata (Dwyer, 1997; Epling, Pierce & Stefan, 1981; Hara & Ogawa, 1984; Kelly Gurley Lambert & Porter, 1992; Pierce & Epling, 1991; Paré, 1989; Watanabe, Hara, & Ogawa, 1990).

Por último, parece que la triada de consecuencias que se produce durante el procedimiento ABA es exclusivo de las ruedas de actividad (Treichler & Hall, 1962), ya que no se obtiene ni con la utilización de túneles (Eayrs, 1954) ni con la cinta continua (Collier & Hirsch, 1971).

3.1.3. Similitudes y diferencias entre la Anorexia Basada en la Actividad y el trastorno de anorexia nerviosa

Hasta el momento hemos visto como el modelo ABA reproduce los signos más conocidos de la enfermedad en humanos: la pérdida de peso, la alimentación restrictiva y la hiperactividad. Pero, además de estos síntomas, el modelo también puede reproducir otras manifestaciones clínicas como la amenorrea, la hipotermia, las anomalías del ciclo sueño y vigilia y la reducción en el volumen de la sustancia gris y blanca. Por el contrario, no puede reproducir los síntomas que se refieren a las preocupaciones por el tamaño y la forma del cuerpo supuestamente anclados en los trastornos de la imagen corporal (Bruch, 1962), tal y como se muestra en la Figura 2.

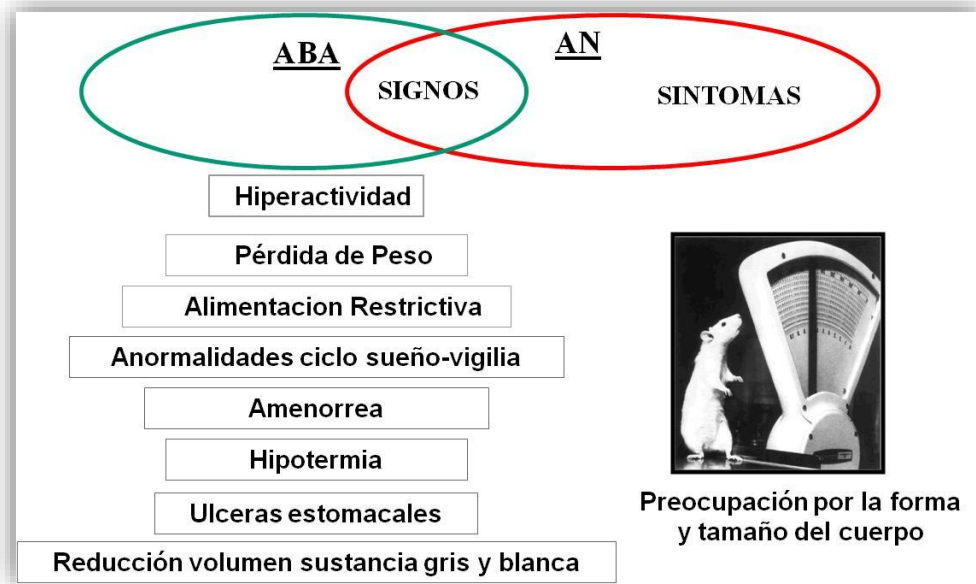


Figura 2. Paralelismo en las manifestaciones presentes en los animales sometidos a ABA y las pacientes con AN. Modificada a partir de Cerrato, 2010.

A pesar de que el criterio diagnóstico referido a la presencia de la amenorrea ha desaparecido en la última versión del DSM-V (APA, 2013), no significa que no sea un signo característico de una gran parte de las pacientes. En el modelo ABA, la pérdida del ciclo estral de ratas hembra ha sido ampliamente documentado y se asoció con la pérdida de peso corporal en relación con la actividad en la rueda ya que ratas sometidas únicamente a restricción de alimento mantienen un ciclo estral regular (Dixon, Ackert, & Eckel, 2003; Watanabe, Hara, & Ogawa, 1992). Por su parte, en humanos, es conocido el hecho de que en mujeres deportistas es relativamente común la pérdida de la menstruación (Epling & Pierce, 1996; Rauh, Nichols & Barrack, 2010; Toro, 1996, 2004).

La hipotermia es una característica que aparece desde las primeras descripciones del trastorno en humanos, como las de Morton (1694) y Gull (1874), y es un signo característico de la anorexia nerviosa (Davies, Fohlin, & Thorén, 1979a, 1979b, Luck & Wakeling, 1980, 1981, 1982; Wakeling & Russell, 1970), que se reproduce también en el procedimiento ABA (Hillebrand, de Rijke, Brakkee, Kas, & Adan, 2005a; Morrow et al., 1997; Paré, 1977). Por otro lado, las pacientes con anorexia nerviosa también presentan problemas de sueño (Crisp, 1985; Wakeling & Russell, 1970) que son reproducidos en el modelo ABA (Kouki Watanabe et al., 1992). Estas dos características parecen estar relacionadas ya que a medida que el animal pierde peso, desciende su temperatura corporal al mismo tiempo que se produce un desajuste en el ciclo circadiano, incrementando la actividad durante las horas de luz (Watanabe et al., 1992), cuando generalmente los roedores son animales nocturnos (Ibuka, Inouye, & Kawamura, 1977).

Otra característica interesante que permite establecer la similitud entre los animales expuestos al procedimiento ABA y las complicaciones médicas de las pacientes, hace referencia

a las úlceras estomacales. Ya habíamos comentado que el hecho de que el criterio de retirada del experimento se estableciese en un 25% de pérdida de peso era con el objeto de evitar que la disminución de la ingesta se debiese a la aparición de úlceras en la porción glandular del estómago, lo cual ocurre cuando el animal alcanza el 30% de pérdida de peso. La presencia de úlceras en pacientes con anorexia nerviosa ocurre hasta en un 16% de los casos (Hall & Beresford, 1989) y fue descrito por primera vez en un paciente masculino en el año 1930 (Berkman, 1930). Esta complicación podría estar relacionada con las continuas quejas que las pacientes expresan en relación con dolores y molestias abdominales, que tantas veces ha sido descrito en la literatura¹¹ (Becker, Thomas, et al., 2009; Berkman, 1944; Du Bois, 1949; Kidd & Wood, 1966; Lasègue, 1873; Lee, Ng, Kwok, Thomas, & Becker, 2012; Loeb, 1964; Makenzie, 1888; McCullagh & Tupper, 1940; Nemiah, 1958; Patterson, 1939; Farquharson & Hyland, 1938; Warren & Vande Wiele, 1973).

Por último, más recientemente se ha detectado una reducción del volumen de sustancia gris y blanca en pacientes con anorexia nerviosa, a través de técnicas de neuroimagen (Monzon et al., 2016; Roberto et al., 2011; Seitz et al., 2016), que también presentan los animales sometidos al procedimiento ABA (Frintrop et al., 2018).

Todas estas semejanzas que permiten relacionar las consecuencias de la combinación de dieta y ejercicio en los animales con las manifestaciones clínicas de las pacientes con anorexia nerviosa permiten fundamentar la analogía del modelo. Pero el propio término de análogo pone de relieve que aparte de las similitudes también existen diferencias, las cuales son empleadas para invalidar su utilidad. A continuación, abordaremos estas cuestiones que son interpretadas como limitaciones en el uso del modelo ABA.

La primera objeción que se le aplica al modelo ABA es su propia condición de modelo animal. Esto hace referencia a que los animales no tienen las capacidades cognitivas inherentes al ser humano como pueden ser el lenguaje o la capacidad de simbolización e introspección y tampoco puede reproducir el entorno familiar y sociocultural en que el trastorno tiene lugar (Coscina & Garfinkel, 1991; Gutierrez, 2013). Por lo tanto, en consecuencia, a la perspectiva multidimensional que subyace a la concepción actual del trastorno, cualquier modelo animal es incapaz de reproducir todos los elementos que configurarían la anorexia nerviosa y sería inútil para abordar la etiología del trastorno (Mrosovsky, 1984).

Otra debilidad que se le recrimina al modelo ABA es la voluntariedad atribuida al proceso de auto-inanición. Mientras que en los animales sometidos al procedimiento ABA se debe a la restricción de alimento impuesta por el experimentador, en las pacientes la restricción es una cuestión voluntaria relacionada con el deseo de adelgazar (Crisp, 1965; Mayer, 1963; Nemiah, 1958), y por lo tanto no son comparables. Sin embargo, si bien esto es cierto, la consideración de la presión social y de los medios de comunicación como incentivos de las dietas y la persecución de un ideal de belleza delgado, los convierten en una forma de control social externo. Por otro lado, debido a las bajas tasas de remisión espontánea y al fracaso de cualquier tipo de psicoterapia, pone de relieve la falta de decisión y control que las pacientes

¹¹ Actualmente se ha descrito la acumulación de grasa en las vísceras de pacientes con anorexia nerviosa (El Ghoch et al., 2012; Rigaud, Boulier, Tallonneau, Brindisi, & Rozen, 2010), que podría también estar relacionado con estas molestias (Coëffier et al., 2016), aunque hay que destacar que esta acumulación de grasa se produce durante el proceso de renutrición.

tienen en este proceso. Además, con la aparición del nuevo DSM-V, se eliminó del criterio diagnóstico el término “rechazo” y se hace referencia únicamente a la restricción de alimento sin imputación de voluntariedad alguna. Por lo que parece, una de las dos principales críticas que se le achacan al modelo ABA, podríamos decir que se ha eliminado.

En conclusión, a pesar de algunas de las limitaciones inherentes a cualquier modelo animal psicopatológico, no podemos obviar su capacidad para generar nuevas hipótesis y para mejorar tratamientos (Shapiro, 2004). Por lo tanto, el empleo del modelo ABA es una estrategia válida y útil para este propósito, y especialmente prioritario para la búsqueda de nuevos tratamientos teniendo en cuenta el desalentador panorama al respecto.

3.2. EL MODELO SIH

El modelo de Hiperactividad inducida por semi-inanición (Broocks, Liu, & Pirke, 1990), al igual que el modelo ABA, se centra en la actividad excesiva de ratas con restricción de alimentos. La diferencia clave entre ABA y SIH radica en la forma en que las ratas se enfrentan a la restricción de alimentos. En el procedimiento SIH la restricción se concreta en una cantidad fija y constante de comida que se suministra cada día a los animales y cuya cantidad viene determinada por un porcentaje (habitualmente un 60%) de los alimentos consumidos durante la fase previa ad libitum. Así, los animales pueden comer esa cantidad durante las 24 horas posteriores a la entrega de los alimentos. En el modelo ABA, como ya hemos descrito, la restricción de alimento es de tipo temporal (90 minutos al día). Normalmente una rata ingiere una media de 20 gramos al día, por lo que cuando el animal es sometido a la restricción de alimento del 60% recibirá 12 gramos diarios de comida, una cantidad superior a lo que suele ingerir normalmente una rata sometida al modelo ABA, que ronda los 8-10 gramos diarios.

Debido a esa menor exigencia en la restricción de alimento, el modelo SIH permite estudiar a los animales durante períodos más prolongados de tiempo ya que, gracias a las raciones superiores de comida y al mayor tiempo de acceso, la pérdida de peso es menos severa y es muy raro que presenten pérdidas de peso más allá del criterio del 25% de pérdida de peso tan frecuente en ABA. Así, de forma comparativa, mientras ABA subraya el efecto de la actividad sobre la ingesta de alimentos, es decir, la auto inanición (Routtenberg & Kuznesof, 1967), el modelo SIH se centra en los efectos de la restricción de alimentos sobre el aumento de la actividad (Gutiérrez, 2013).

El modelo ABA ha recibido más atención por parte de la investigación que el modelo SIH quizás por su mayor exigencia, y por lo tanto en las consecuencias de su afrontamiento. Esta mayor exigencia se refleja en el hecho que para el 80% de los animales expuestos a ABA, la pérdida de peso es tan acusada que los animales han de ser retirados del procedimiento experimental cuando alcanzan un criterio de pérdida de peso del 25%, para evitar la muerte inminente de los animales debido a la auto- inanición. Por otro lado, la cantidad de alimento proporcionado a los animales expuestos a SIH permite una pérdida de peso menos sustancial y, por lo tanto, se evita la auto inanición.

4. LA HIPERACTIVIDAD EN LA ANOREXIA NERVIOSA Y EN LOS MODELOS ANIMALES

4.1. ¿POR QUÉ LAS RATAS CORREN EN UNA RUEDA DE ACTIVIDAD?

Desde que se usó por primera vez la rueda de actividad ha sido un reto explicar qué hace correr a las ratas en las ruedas de actividad, especialmente cuando se encuentran expuestas a un programa de alimentación restringida, si bien estas se involucran siempre que tienen oportunidad, aunque no reciban ninguna recompensa (Sherwin, 1998).

Por un lado, la actividad en la rueda fue considerada como una conducta adjuntiva inducida por el propio programa de alimentación que no llevaría asociada ninguna ventaja evolutiva (Gutiérrez & Pellón, 2002; Levitsky & Collier, 1968) o un recurso adaptativo que aumenta las posibilidades de encontrar otras fuentes de alimentos (Epling & Pierce, 1996; Fessler, 2002; Richter, 1992). Con respecto a esta última, la conducta de forrajeo estaría reservada a determinados miembros de la especie, que permitiría una mejor distribución del alimento en aquellos que no realizan la conducta migratoria. Esta hipótesis podría explicar otras características que se presentan en la anorexia nerviosa como el pensamiento rígido, el bajo peso, la hiperactividad y el lanugo, consideradas como preservadas por la evolución (Arun, 2008).

Sin embargo, una de las interpretaciones que recibe más atención por parte de la investigación es aquella que vincula el ejercicio físico con los circuitos límbicos implicados en el reforzamiento (Esch & Stefano, 2004), y más concretamente el sistema dopaminérgico y opioide, ya que están implicados en imprimir el valor gratificante de la actividad (Foldi, Milton, & Oldfield, 2017a, 2017b).

El sistema mesolímbico dopaminérgico envía sus proyecciones al núcleo accumbens desde el área tegmental ventral (VTA del inglés, *ventral tegmental area*), ejerciendo control sobre la motivación y la actividad motora (Fulton et al., 2006; Greenwood et al., 2011; Wise, 2004). Además, el ejercicio inducido por la alimentación restringida se puede catalogar como un tipo de estrés crónico que tiene como consecuencia la secreción de glucocorticoides, como la corticosterona. Esta sustancia modula las neuronas dopaminérgicas ya sea aumentando la tasa de disparo o estimulando la síntesis de dopamina en el VTA y en consecuencia activando el sistema de recompensa dopaminérgico (Rivest & Richard, 1990; White, Martin, Burden, & Dean, 1993).

Por otro lado, la actividad derivada de la restricción de alimento produce la liberación de péptidos opioides endógenos (Doerries et al., 1991; Epling & Pierce, 1991) que elevan el umbral del dolor en situaciones de estrés, retrasan la fatiga, inhiben la ingesta y aumentan la actividad en la rueda (Aravich, Rieg, Lauterio, & Doerries, 1993; Dubreucq et al., 2013; Schebendach, Klein, Foltin, Devlin, & Walsh, 2007). Además, la leptina, que se presenta a bajos niveles debido a la pérdida de peso, tiene la capacidad de disminuir la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas y en consecuencia disminuir la actividad física (Hommel et al., 2006) que parece estar relacionado con la inhibición del efecto reforzante de dicha actividad física (Evans & Anderson, 2017; Evans, Kumar, Inglis & Anderson, 2018; Fernandes et al., 2015).

Finalmente, existe una creciente evidencia a través de estudios de neuroimagen que respaldan la implicación de estos procedimientos de reforzamiento en el desarrollo y mantenimiento de la anorexia nerviosa (Frank et al., 2012; Frank & Shott, 2016; Kaye, Fudge, & Paulus, 2009; O'Hara, Campbell, & Schmidt, 2015; Treasure et al., 2015).

4.2. LA HIPERACTIVIDAD COMO LA CENICIENTA DE LOS SIGNOS Y SÍNTOMAS DE LA ANOREXIA NERVIOSA

Con el desarrollo del modelo ABA como un modelo análogo de la anorexia nerviosa se ha puesto sobre la mesa una nueva perspectiva teórica del trastorno, de tipo bioconductual, en el que la hiperactividad presente en la gran mayoría de casos explicaría los cambios conductuales y psicológicos de las pacientes (Epling et al., 1983). Esta perspectiva, por lo tanto, exige una revisión de la importancia clínica asignada a la hiperactividad en la conceptualización teórica de la anorexia nerviosa ya que contrasta con la teoría actual en el que son los cambios psicológicos los que provocarían el trastorno y, por ende, la hiperactividad. Así, gracias a esta nueva concepción se pone de relieve la importancia de la hiperactividad como un síntoma clave en la anorexia nerviosa.

Se estima que alrededor de un 80% de las pacientes con anorexia nerviosa presentan alguna forma de actividad excesiva (Davis, Blackmore, Katzman, & Fox, 2005). De hecho, se trata de una característica que ha sido descrita continuamente a lo largo de la historia e incluso aparece en las primeras descripciones del trastorno realizadas por Morton (1684), Gull (1874) y Lasègue (1873). Así, el término hiperactividad engloba diferentes comportamientos, aunque actualmente se emplean tres parámetros para ayudar a determinar el rasgo excesivo: la frecuencia y cantidad de ejercicio, el rasgo obligatorio del ejercicio (sentirse mal por no hacerlo), el cual es considerado más importante, y la motivación por el ejercicio (Coëffier, Achamrah, & Déchelotte, 2016).

Pero además de ser una característica constante en el tiempo, la hiperactividad ha sido reconocida por autores afiliados a diferentes corrientes teóricas, como el psicoanálisis (Kaufman & Heiman, 1964) o la modificación de la conducta (Blinder et al., 1970). De hecho, la misma Hilde Bruch, y también otros autores, destaca la precedencia del aumento de la actividad antes de la reducción de la ingesta (Bruch, 1973; Davis et al., 2005; Janet, 1903). Además, la hiperactividad se utilizó como criterio de exclusión para diferenciar otros trastornos que cursaban con inanición como la enfermedad Simmond (Escamilla, 1944), el Mal de Addison (Farquaharson & Hyland, 1938) e incluso para diferenciar la anorexia secundaria a otro cuadro clínico (King, 1963).

No fue hasta la publicación de Kron et al. (1978) que la hiperactividad logró mejorar su estatus, siendo este artículo la primera vez en la literatura que se pone de manifiesto la relevancia clínica de esta característica y su posible papel en la etiología del trastorno. Además, supuso la primera estimación objetiva de la hiperactividad como una característica premórbida, aspecto que fue confirmado por Beumont en otra muestra de pacientes (Beumont, Booth, Abraham, Griffiths & Turner, 1983; Toyuz, Beumont & Hook, 1987).

A pesar de esta reiteración en el reconocimiento de este comportamiento, a efectos diagnósticos desde la aparición del DSM-III (APA, 1980) y en las posteriores revisiones hasta el actual DSM-V (APA, 2013), la hiperactividad se ha considerado como un factor secundario y una mera estrategia voluntaria para perder peso, ganándose la calificación de “Cenicienta” entre los síntomas del trastorno (Gutiérrez & Vázquez, 2000).

Actualmente, la hiperactividad es considerada como una característica con significación clínica propia que cada vez recibe más atención. De hecho, se ha demostrado que es un potente modulador del mecanismo de recuperación de la composición corporal (Kostrzewa et al., 2013), además de afectar negativamente a otros aspectos como el estado psicológico, la calidad de vida, el tiempo de hospitalización, la probabilidad de cronificación del trastorno e incluso se considera uno de los mayores factores de riesgo predictivos de la recaída después de la recuperación (Coëffier et al., 2016). Por otro lado, controlar la hiperactividad en el ambiente hospitalario y ambulatorio supone un gran desafío, que ya fue anotado por Gull (1974), y es considerada una conducta no deseada y molesta (Blinder et al., 1970). En consecuencia, probablemente se debe evitar la persistencia de la actividad, aunque estudios recientes han demostrado que la supresión completa de cualquier actividad física en pacientes hospitalizados no sería del todo adecuada, ya que la aplicación de una Actividad Física Programada (PPA, del inglés *Programed Physical Activity*), aparte de ser seguro y no perjudicial, produce beneficios tanto físicos como psicológicos (Coëffier et al., 2016).

Al igual que ocurre con las ratas expuestas al modelo ABA, la interpretación de la hiperactividad en humanos ha recibido diferentes explicaciones. A parte de la definición de Bruch, donde la hiperactividad, el ejercicio extenuante o cualquier forma poco saludable de actividad excesiva, es solo una de las varias estrategias para perder peso al servicio de una imagen corporal distorsionada, la investigación ha propuesto otras cuatro explicaciones bien complementarias, bien alternativas a la utilización de la actividad física como estrategia de pérdida de peso, a saber:

- 1) Su función como estrategia de afrontamiento ante la ansiedad (Holtkamp, Hebebrand, & Herpertz-Dahlmann, 2004).
- 2) Su papel en la regulación del afecto negativo (Bratland-Sanda et al., 2010).
- 3) Respuesta desencadenada por la hipoleptinemia producida por la pérdida de peso consecuente con la restricción alimenticia de las pacientes con anorexia nerviosa (Hebebrand et al., 2003).
- 4) Respuesta bioconductual de adaptación para compensar la hipotermia (Gutiérrez, Vázquez, & Boakes, 2002).

Más adelante nos centraremos en estas dos últimas interpretaciones, relacionadas con la hipoleptinemia y la hipotermia, ya que son la base para el desarrollo experimental de la presente tesis doctoral.

4.3. PREVENCIÓN Y REVERSIÓN DE LA ACTIVIDAD EN EL MODELO ABA

La primera vez que se trató de revertir las consecuencias del procedimiento ABA, fue a través del tratamiento con Clorpromazina y fue realizada por los mismos Routhenberg &

Kuznesof (1967), logrando reducir la hiperactividad y aumentando la ingesta de los animales, que se recuperaron. Actualmente, se han probado diferentes agentes farmacológicos, pero principalmente se han estudiado aquellos agonistas o antagonistas de receptores de los sistemas dopaminérgicos, serotoninérgicos, melanocortinérgicos y opioides, ya que se ha demostrado que se presentan alterados en pacientes con anorexia nerviosa (Clarke, Weiss, & Berrettini, 2012; Foldi, Milton, & Oldfield, 2017b; Kaye, Wierenga, Bailer, Simmons, & Bischoff-Grethe, 2013; Scherma et al., 2017; Södersten, Bergh, Leon, & Zandian, 2016).

En general, los estudios que han probado estos agentes farmacológicos se centraron en la prevención del desarrollo de ABA, es decir, que el tratamiento fue administrado desde el inicio del procedimiento ABA o incluso antes. Sin embargo, otra estrategia se centra en revertir la pérdida de peso, la hiperactividad o la disminución de la ingesta una vez que están ya desarrolladas. Mientras la estrategia de prevención enlaza más con la búsqueda de la etiología del trastorno, la reversión encaja perfectamente en el propósito de desarrollar tratamientos eficaces (Cerrato, 2010).

Así, actualmente sólo se conocen dos tratamientos que se hayan mostrado eficaces a la hora de revertir alguna de las consecuencias del modelo ABA: la elevación de la temperatura ambiental y el uso de leptina exógena, las cuales vamos a explicar en detalle a continuación.

4.4. EFECTO DE LA TEMPERATURA AMBIENTAL EN EL MODELO ABA: LA HIPERACTIVIDAD COMO MECANISMO DE TERMORREGULACIÓN

Anteriormente ya adelantábamos que una de las explicaciones de la hiperactividad en pacientes con anorexia nerviosa implica directamente a la temperatura ambiental. Esta interpretación, que surge de la investigación con el modelo animal ABA, considera la hiperactividad como una respuesta adaptativa para compensar la hipotermia derivada de la pérdida de peso. Pero antes de centrarnos en ella y en la evidencia que la respalda tanto en el modelo ABA como en humanos, haremos un breve recorrido sobre la importancia que se le ha dado a la temperatura ambiental en el desempeño de los animales expuestos simultáneamente a privación de comida y acceso a una rueda de actividad.

4.4.1. “Activity-Based Anorexia: Ambient temperature has been a neglected factor” (Gutiérrez et al., 2002)

La temperatura ambiente tiene una clara influencia en la ingesta y en el gasto energético, y consiguientemente, en el balance energético (Moellering & Smith, 2012). A finales de los años 40, Brobeck (1945, 1948, 1960) ya propuso que la temperatura ambiental es un elemento clave para estudiar el balance energético, especialmente cuando se monitoriza la ingesta pues existe una relación inversa entre la temperatura ambiente y el consumo de alimento. Sin embargo, no es hasta finales de los años 70, en que se plantea por primera vez que el aumento de la actividad que sufren las ratas expuestas al procedimiento ABA es una estrategia para evitar el descenso de la temperatura corporal (Paré, 1977).

A pesar de esto, la temperatura ambiente fue un factor que se pasó por alto en la investigación con el modelo ABA, tal y como quedó reflejado en la publicación del artículo “*Activity-Based Anorexia: Ambient temperature has been a neglected factor*” por Gutiérrez, Vázquez & Boakes (2002). Hasta este momento no se reparó en que la mayoría de las investigaciones realizadas con el modelo animal ABA no informaban, o lo hacía deficientemente, de datos relacionados con la temperatura ambiental, poniendo de manifiesto la falta de control, y también, la ausencia de reconocimiento de este factor como potencialmente importante.

No obstante, y como pone de manifiesto dicho artículo, existen observaciones en la literatura de la relevancia de la temperatura ambiente sobre las consecuencias de someter a ratas a las condiciones de acceso a rueda de actividad y restricción de alimento simultáneamente, aunque surgieron dentro del procedimiento de Estrés por Actividad (AS) y en un primer momento de forma accidental. Este es el caso de Kelly Lambert, que interesada en el desarrollo de úlceras a través del procedimiento de AS, observó que como resultado de un accidental aumento de la temperatura ambiente del laboratorio hasta 26.5°C, las ratas no mostraron el esperado aumento de la actividad en las ruedas una vez que fueron sometidas a la restricción de alimentos (Lambert, 1993). En consecuencia, la propia autora realizó un experimento con el objeto de confirmar los resultados anteriores. Así, nuevamente detectó que los animales expuestos a una temperatura ambiente de 25°C corrieron significativamente menos, presentaban un menor número de úlceras estomacales y aumentaron la tasa de supervivencia¹² en comparación con otro grupo de animales expuestos a 19,5°C. Por desgracia estos resultados nunca fueron publicados y únicamente fueron presentados en una reunión de la Southern Society for Philosophy and Psychology en Kentucky (Lambert & Hanrahan, 1990).

Otra evidencia experimental que también proviene de la utilización del modelo AS es el estudio de Morrow et al. (1997), en el que un grupo de animales fueron alojados en jaulas a una temperatura ambiente de 37°C tras haber presentado hipotermia y síntomas de ulceración. Los resultados demostraron un efecto beneficioso del calor en la supervivencia de los animales, ya que estos sobrevivieron el doble de tiempo que los animales expuestos a una temperatura de 21°C. Pero los autores no atribuyeron ninguna importancia al efecto del calor sobre la reducción de la actividad ni sobre la facilitación de la ingesta, concluyendo que la mayor supervivencia de estos animales se debe a la menor formación de úlceras. Es más, llegan a afirmar que esta mayor supervivencia y menor ulceración en las ratas sometidas a calor “*no puede ser atribuida a la reducción de la actividad en la rueda durante el período de calentamiento*” (p. 823).

Teniendo en cuenta la escasa relevancia que Morrow et al. (1997) atribuyen a las repercusiones que el calor tiene sobre el comportamiento de los animales ante las condiciones experimentales del modelo AS, no es de extrañar que también fuese una cuestión ignorada en el modelo ABA.

¹² Mientras que los animales expuestos a una temperatura ambiente de 19,5°C empezaron a morir a partir del Día 3 del experimento, los animales a 26.5°C tardaron dos días más e incluso tres de ellos consiguieron sobrevivir a los 14 días del estudio, lo que suponía un 27% de la muestra total.

4.4.2. La interpretación termorregulatoria de la actividad

“One cannot study food intake without specifying or controlling the conditions of temperature regulation” (Brobeck, 1960, p. 448).

Además de realizar una exhaustiva revisión del papel de la temperatura ambiental en la bibliografía de animales expuestos a libre acceso a rueda de actividad y alimentación restringida en su artículo *“Activity-Based Anorexia: Ambient temperature has been a neglected factor”*, Gutiérrez et al. (2002) proponen una nueva interpretación de la hiperactividad y su posible implicación en la reversión de ABA y en el tratamiento del trastorno en humanos, fundamentándose en la teoría de la termorregulación de Brobeck (1945, 1948), que como ya hemos comentado, considera que la temperatura ambiental es indispensable para estudiar la regulación del balance energético.

Según el planteamiento de Gutiérrez et al. (2002), la hiperactividad actuaría como un mecanismo para mantener la temperatura corporal que se ve comprometida a causa de la restricción de alimento. Sin embargo, debido al efecto que ejerce la actividad inhibiendo la ingesta, el equilibrio inicial se rompe y potencia la hipotermia que pretendía ser paliada.

En la literatura ya se conoce que la restricción tanto de actividad como de alimento produce la disminución de la temperatura rectal y cutánea, existiendo una relación inversa entre el nivel de actividad y la temperatura ambiente establecida en el laboratorio. Así, la actividad aumenta a medida que disminuye la temperatura ambiente (Stevenson & Rixon, 1957). Por otro lado, Morrow et al. (1997) sugieren que la variabilidad en la temperatura corporal de los animales durante el primer día que se someten a la restricción de alimento es determinante en la supervivencia de los animales, ya que aquellos que presentaban mayor variabilidad tenían menos probabilidades de sobrevivir al procedimiento, convirtiéndose en un posible factor de predisposición.

Pero esta interpretación termorregulatoria de la hiperactividad no pretende explicar la actividad de los animales desde el primer día, ya que existe evidencia de ciertos niveles de actividad cuando la temperatura ambiente está cercana o dentro del rango de la termoneutralidad (Altemus, Glowa, Galliven, Leong, & Murphy, 1996; Bolles & Duncan, 1969; Campbell & Lynch, 1967, 1968). Aunque, por otro lado, estos mismos estudios muestran que la actividad de los animales calentados es tres veces menor que la que muestran los animales a una temperatura de 20°C. Por lo tanto, se argumenta que la termorregulación no es el único factor implicado en el aumento de la actividad en la rueda, ya que, además, esto ocurre antes de que descienda la temperatura corporal de los animales (Morrow et al., 1997).

En conclusión, la relación inversa que existe entre la actividad en la rueda y la temperatura ambiental es de gran importancia porque al disminuir dicha actividad, la pérdida de peso también disminuye, favoreciendo la inhibición del gasto energético y aumentando la supervivencia. Además, conociendo el efecto inhibitor que tiene la actividad sobre la

alimentación, una baja actividad dejaría de ejercer interferencia sobre esta inhibición de la ingesta (Gutiérrez & Vázquez, 2000).

4.4.3. Evidencia a favor de la teoría de la termorregulación en el modelo ABA

Actualmente, la interpretación termorregulatoria de la hiperactividad cuenta con un soporte experimental desarrollado con el modelo ABA.

El primer estudio que se realizó para evaluar los efectos del calor en el modelo ABA fue el publicado por Hillebrand et al., (2005a). En este estudio, no se realiza una manipulación de la temperatura ambiente, ya que esta siempre permanece estable a 21°C, sino que los animales tienen la oportunidad de acceder a una fuente de calor que consiste en una placa caliente (concretamente a 37°C), situada de forma adyacente a la rueda. Los resultados mostraron que ante una situación de acceso a rueda de actividad y alimentación ad libitum, los animales no mostraban ningún tipo de preferencia por ningún área de la caja, pero cuando eran sometidas a restricción de alimento, sí preferían permanecer en la zona calentada y previnieron la hipotermia. Además, también permitió que corriesen menos y perdiesen menos peso que los animales que no tenían acceso a la placa caliente.

Un año después, Gutiérrez, Baysari, Carrera, Whitford, & Boakes, (2006) publicaron una serie de cuatro estudios que fueron ejecutados desde el año 2001, y que supusieron el primer examen del efecto de la temperatura ambiente sobre la actividad y la pérdida de peso en el modelo ABA. Para ello compararon los efectos de dos intensidades de temperatura ambiental: Estándar (21°C) y Elevada (27°C-29°C). Tomados en conjunto, estos estudios demostraron que la temperatura ambiental modula la actividad y la pérdida de peso incluso cuando la actividad es restringida a 3 horas diarias. Además, cuando estos ya han perdido un gran porcentaje de peso y se bloquea el acceso a la rueda, solo se pueden recuperar si se eleva la temperatura ambiental.

En esta misma línea, y más interesante desde un punto de vista traslacional, posteriormente se realizaron una serie de publicaciones en las que la elevación de la temperatura ambiental también logró revertir la pérdida de peso y la actividad excesiva una vez que esas características habían sobrepasado el punto de no retorno, es decir, en el que la recuperación espontánea es casi imposible (Gutiérrez, Cerrato, Carrera, & Vázquez, 2008). Este efecto de la elevación de la temperatura ambiental se replicó también en hembras (Cerrato, Carrera, Vázquez, Echevarría, & Gutiérrez, 2012), algo sumamente raro en la literatura, poniendo de relieve el efecto del dimorfismo sexual y la repercusión diferente de la actividad en la rueda sobre la ingesta y la evolución del peso en machos y hembras. Además, también supuso la demostración experimental del efecto relativo de la ingesta sobre el peso corporal en función de la temperatura ambiental, demostrando que en condiciones de ingesta restringida la temperatura ambiental tiene mayor repercusión sobre el peso que la cantidad de comida ingerida (Cerrato et al., 2012). Por otro lado, también se demostró que el calor produjo cambios bioquímicos en el sistema de melanocortinas (Gutiérrez et al., 2009). Todos estos estudios suponen la primera reversión en la literatura del modelo ABA, lo cual adquiere más relevancia teniendo en cuenta la magnitud del efecto experimental encontrado ya que la recuperación del

100% de las ratas macho y hembras calentadas, se logra aun cuando los animales continúan expuestos a las condiciones de acceso a rueda de actividad y alimentación restringida.

Lamentablemente, en estos estudios en los que se evaluó el efecto de la temperatura ambiente sobre las consecuencias del modelo ABA, no se monitorizó la temperatura corporal de los animales, aspecto que hemos subsanado en la realización de la presente tesis.

4.4.4. Efecto de la temperatura ambiental en pacientes con anorexia nerviosa

La primera referencia que relaciona la temperatura ambiental con la anorexia nerviosa en humanos surgió en un editorial de *The Lancet* en 1888. Se trataba de un comentario acerca del último artículo que publicó Gull: “La mayoría de los casos parecen ocurrir en los meses fríos del año, y posiblemente esto puede ser más que una coincidencia” (Anónimo, 1888, p.584). Sin embargo, la primera referencia al efecto del calor en el tratamiento de estas pacientes se había producido en el primer artículo de William Gull, en el que acuña el término de “anorexia nerviosa” en 1874, cuando recomienda: “*administrar calor externo, además de comida, a las pacientes*” (Gull, 1874, p. 24). Esta recomendación fue enunciada sobre la base de las experiencias con animales realizadas por el fisiólogo suizo, Charles Chossat. Este autor documentó los efectos beneficiosos del calor en animales hambrientos (Chossat, 1843) ciento sesenta y cinco años antes de la primera demostración experimental de la reversión por el calor de las fatales consecuencias del modelo ABA.

No obstante, en los últimos años se ha acumulado evidencia que indica que la temperatura ambiental tiene un papel relevante en la expresión del trastorno y el beneficio que podría suponer suministrar calor a las pacientes como tratamiento adjunto (Bergh, Brodin, Lindberg, & Södersten, 2002; Birmingham, Gutierrez, Jonat, & Beumont, 2004; Gutiérrez & Vázquez, 2001).

En un estudio realizado en Utrecht (Holanda) supuso la primera vez en la literatura científica que una investigación tiene en cuenta el efecto de la temperatura ambiental en la actividad física de pacientes con anorexia nerviosa, además de ser una extrapolación directa a humanos de los estudios realizados en animales con el procedimiento ABA (Carrera et al., 2012). Además de la actividad física de las pacientes a través de acelerómetros (Actiwatch) durante tres días consecutivos, también se midieron otros parámetros. Los resultados de este estudio revelaron que las pacientes adolescentes con anorexia nerviosa en los meses más fríos del año eran significativamente más activas que en los meses cálidos. Lo importante de este estudio es que debido a las medidas tomadas a lo largo del estudio se pudo descartar que la actividad física en las pacientes estuviera relacionada con diferencias en la insatisfacción corporal o el ansia por la delgadez (ambas medidas por las subescalas BD -body dissatisfaction-, y DT -drive for thinness- del EDI-2), ni por la puntuación total en el EDI-2 (Garner, 1991), o en el cuestionario de depresión (Children’s Depression Inventory; CDI; Kovacs, 1992), o las medidas de ansiedad (State-Trait Anxiety Inventory, STAI; Spielberger, Gorsuch, & Lushene, 1970). Aunque las pacientes más activas durante los meses fríos del año tenían un menor IMC y por consiguiente unos niveles menores de leptina en sangre, la única variable seleccionada por los análisis de regresión fue la temperatura ambiental.

Además, esta relación entre la temperatura ambiental y la actividad física se vio reforzada por un análisis realizado sobre un subconjunto de ocho pacientes para las cuales se produjo una diferencia en la temperatura ambiental de unos 6° C entre alguno de los tres días consecutivos en los que las pacientes llevaban el Actiwatch. Para este grupo de pacientes, en las que obviamente las medidas psicológicas, así como su supuesta distorsión de la imagen corporal eran constantes (al igual que los niveles de leptina), la actividad física fue significativamente más acusada en los días más fríos. Esto permitió descartar las explicaciones más habituales de la hiperactividad, desde la psicopatología específica de este tipo de trastornos (insatisfacción corporal, ansia por la delgadez), o aspectos más generales (depresión, ansiedad) a medidas fisiológicas (hipoleptinemia), quedando estas contribuciones en un segundo plano frente a la modulación ejercida por la temperatura ambiental.

Otro estudio realizado en la Unidad de Trastornos de la Alimentación del Hospital Niño Jesús de Madrid reveló que las diferencias en el IMC entre los subtipos diagnósticos de la anorexia nerviosa, compulsivo-purgativo (ANP) y restrictivo (ANR) se debieron a las diferencias de peso corporal durante los meses más fríos del año (Fraga et al., 2015). Esto indicó diferencias en el patrón estacional de fluctuación de peso en función del subtipo diagnóstico, siendo el patrón de las pacientes diagnosticadas con el subtipo ANP similares a las de la población general (Tucker & Gilliland, 2007), es decir, que presentan un IMC más alto durante los meses más fríos del año y más bajo en los más cálidos. Por otro lado, las pacientes diagnosticadas con el subtipo ANR fue el opuesto. También es de destacar que, debido a estas diferencias estacionales en el IMC, la duración de la estancia hospitalaria fue significativamente mayor en las pacientes ANR durante el semestre frío.

Al margen de la hiperactividad, pero relacionado también con un parámetro relevante en la anorexia nerviosa como es la afectación del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, Favaro & Santonastaso (2009) señalan que la temperatura ambiental en la anorexia nerviosa está significativamente relacionada con la recuperación de la menstruación durante los meses más cálidos del año. Así, durante la primavera y el verano las pacientes con anorexia nerviosa recuperan la menstruación sin uso de terapia hormonal a pesar de que su peso es inferior (en torno a un promedio de 2 kg) con respecto al peso registrado en los meses de invierno. Los autores explican que esta mayor probabilidad de recuperación de la menstruación en las estaciones cálidas estaría relacionada con una menor necesidad de gasto energético asociado a la termorregulación en estas estaciones del año.

Por último, una evidencia empírica de la posible existencia de una relación entre la temperatura ambiental y en este caso la incidencia de la anorexia nerviosa, aunque más indirecta, se desprende de la existencia de una relación entre la latitud geográfica e indicadores bibliométricos de la literatura (Gutierrez et al., 2017; Gutierrez, Carrera, Vazquez, & Birmingham, 2013; Vazquez, Carrera, Birmingham, & Gutierrez, 2006). Así, se encuentra de forma sistemática, en la revisión de los últimos veinticinco años de la literatura científica sobre la anorexia nerviosa, que en el 72% de las referencias bibliográficas para la anorexia nerviosa se sitúan en el hemisferio Norte (que agrupa el 95% de las referencias totales) concretamente en el rango de latitudes 40-55° N.

Por lo tanto, no solo los animales expuestos a ABA, sino las pacientes con anorexia nerviosa también son un ejemplo de la influencia de la temperatura ambiental en la ecuación del equilibrio energético¹³.

4.5. LA TEORÍA DE LA HIPOLEPTINEMIA COMO CAUSA DE LA HIPERACTIVIDAD

Otra de las teorías explicativas de la hiperactividad en el modelo ABA y en pacientes con anorexia nerviosa hace referencia a su relación con la hipoleptinemia resultante de la pérdida de peso. La leptina es una hormona sintetizada y secretada por los adipocitos considerada la principal hormona periférica moduladora de energía, encargada de regular tanto la ingesta como el gasto energético (Friedman & Halaas, 1998). Se trata de una señal anorexigénica cuya función sería como un marcador de los depósitos de grasa del organismo (Schwartz, Woods, Porte Jr, Seeley, & Baskin, 2000) y que actúa a través de la activación de las neuronas POMC y la inhibición de las neuronas AgRP, reduciendo la ingesta (Baskin, Breininger, & Schwartz, 1999; Clifton, Steiner, & Cheung, 1997; Cowley et al., 2001; Korner, Savontaus, Chua Jr, Leibel, & Wardlaw, 2001). Además, también induce un incremento del gasto energético y la termogénesis a través de la activación del sistema nervioso simpático (SNS) (Dodd et al., 2015; Pandit, Beerens, & Adan, 2017; Van Dijk, 2001).

Así, los niveles de leptina disminuyen en consecuencia a la reducción en los depósitos de grasa, por lo tanto, los niveles de leptina en las pacientes con anorexia nerviosa disminuyen, desarrollando hipoleptinemia (Bosy-Westphal et al., 2005; Föcker et al., 2011; Haas, Gaskin, Kohn, Clarke, & Müller, 2010; Korek et al., 2013; Misra et al., 2005). La propuesta de que la hipoleptinemia es la causa que subyace a la hiperactividad característica de las pacientes con anorexia nerviosa surge de un único estudio que no ha sido replicado hasta el momento desde su publicación en el año 2000, y en el que la administración de leptina exógena amortiguaba el exceso de actividad en ratas expuestas al modelo SIH, aunque no se tradujese en una mayor ganancia de peso (Exner et al., 2000).

Posteriormente, otro estudio realizado esta vez con el modelo ABA también evidenció que la administración de leptina, en este caso de forma intracerebroventricular (ICV), inhibía la actividad excesiva en la rueda, pero tenía un efecto negativo sobre la ingesta de los animales reduciéndola. Este efecto sobre la ingesta produjo una gran pérdida de peso que junto con la hipotermia que sufrían estos animales hizo que tuvieran que ser retirados del experimento

¹³ Más recientemente, un estudio con pacientes hospitalizadas mostró cómo el permanecer durante hora y media en una habitación a una temperatura ambiente de 32°C, después de haber comido, redujo la ansiedad de las pacientes (Zandian, Holmstedt, Larsson, Bergh, Brodin, y Södersten, 2017). Esta temperatura ambiental empleada es la misma que se aplicó para la reversión de las consecuencias en el modelo ABA (Cerrato et al., 2012; Gutiérrez et al., 2008; Gutiérrez et al., 2009). Esta utilización de la aplicación del calor en pacientes con anorexia nerviosa fue descrita por primera vez por William Gull en 1873, en su conferencia del 24 de octubre ante la Clinical Society de Londres “*I have observed that in the extreme emaciation, when the pulse and respiration are slow, the temperature is below the normal standard. This fact together with the observation made by Chossat on the effect of starvation on animals, and their inability to digest food in the state of inanition, without the aid of external heat, has direct clinical bearings- it being often necessary to supply external heat as well as food to patients. The best means of applying heat is to place an india-rubber tube, having a diameter of 2 inches and a length of 3 or 4 feet, filled with a hot water along the spine of the patient, as suggested by Dr. Newington, of Ticehurst*”. (Gull, 1874, p. 24). Sin embargo, esta recomendación fue pasada por alto en el tratamiento de la anorexia nerviosa durante casi siglo y medio hasta la publicación del trabajo de Gutierrez & Vazquez (2001) en el que describen la utilización de tres estrategias diferentes de aplicación de calor en el manejo de la hiperactividad en pacientes con anorexia nerviosa.

(Hillebrand, Koeners, de Rijke, Kas, & Adan, 2005b). Además, la administración aguda de leptina en el VTA también inhibe la hiperactividad, pero con efectos negativos sobre la ingesta (Verhagen, Luijendijk, & Adan, 2011).

Basándose en estos resultados se ha planteado la hipótesis de una influencia biológica en el desarrollo de la hiperactividad de las pacientes con anorexia nerviosa vinculada a la baja secreción de leptina a causa de la pérdida de peso (Kas, van Dijk, Scheurink, & Adan, 2003; de Rijke, Hillebrand, Verhagen, Roeling, & Adan, 2005; Stengel et al., 2017). Varios estudios con pacientes han explorado y constatado esta relación de hiperactividad e hipoleptinemia (Ehrlich et al., 2009; Exner et al., 2000; Holtkamp et al., 2004, 2006; Nogueira et al., 2010; van Elburg, Kas, Hillebrand, Eijkemans, & van Engeland, 2007) pero también otros estudios más recientes han encontrado una falta de asociación (Kostrzewa et al., 2013; Stengel et al., 2017). En general, la mayoría de estos estudios que encuentran una relación entre la actividad excesiva de las pacientes con anorexia nerviosa y los bajos niveles de leptina se realizaron en adolescentes o jóvenes adultos, mientras que en adultos esta relación no parece estar presente (Stengel et al., 2017; van Elburg et al., 2007). Además, parece que esta asociación no es lineal, sino que depende de la edad, la duración o la etapa del trastorno en la que se encuentra la paciente. Así, al inicio del trastorno, los niveles de leptina podrían aumentar un comportamiento de búsqueda de alimentos que se traduciría en una mayor actividad física, la cual se mantiene hasta que se produce una adaptación a estos bajos niveles de leptina, por lo que los niveles de actividad ya no se verían influenciados por esta hormona (Stengel et al., 2017). Por otro lado, también es importante destacar que debido a que la hiperactividad se puede manifestar de muchas formas diferentes (Kostrzewa et al., 2013), la ausencia de un punto de corte aceptado que defina una actividad excesiva en las pacientes con anorexia nerviosa (Coëffier et al., 2016) y la utilización de técnicas subjetivas para cuantificar la hiperactividad, dificultan la interpretación y comparación de todos estos estudios (Stengel et al., 2017).

Actualmente, el tratamiento de la anorexia nerviosa con leptina no está permitido por la comunidad médica, pero con la aprobación de un análogo sintético de la leptina, la metreleptina, para el uso terapéutico en pacientes con lipodistrofia (Farr, Gavrieli, & Mantzoros, 2015), cada vez existe más presión para la utilización de leptina exógena en pacientes afectados con este trastorno (Hebebrand & Albayrak, 2012). La lipodistrofia se caracteriza por una pérdida total o parcial del tejido adiposo que presenta diferentes manifestaciones clínicas y tiene diversas causas, aunque todas parecen compartir una deficiencia de leptina (Garg, 2004; Lightbourne & Brown, 2017). El tratamiento con metreleptina demostró ser eficaz para mejorar el perfil metabólico de estos pacientes con lipodistrofia (Chan et al., 2011; Cochran, Gorden, Diker-Cohen, & Brown, 2015), por lo que se cree que es probable que en el futuro se apruebe su aplicación en pacientes con anorexia nerviosa (Stengel et al., 2017).

Pero los resultados obtenidos con los modelos animales y en pacientes con lipodistrofia limitan el valor terapéutico de la administración de metreleptina ya que el objetivo de cualquier tratamiento es la normalización de los hábitos alimentarios y la restauración del peso corporal (Attia, Marcus, Walsh & Guarda, 2017; Attia & Walsh, 2009). Sin embargo, Hebebrand & Albayrak (2012), opinan que, si los pacientes son monitorizados de manera exhaustiva, el impacto negativo que podría tener en la ingesta y la recuperación del peso sería despreciable y por lo tanto las pacientes serían más susceptibles de recuperar el peso y el período de

recuperación se vería disminuido. Pero estudios realizados con mujeres delgadas que hacen ejercicio de forma vigorosa y que presentan hipoleptinemia, mostraron que el tratamiento con metreleptina produjo reducción del tejido adiposo incluso cuando la dosis fue controlada cuidadosamente para evitar la pérdida de peso (Sienkiewicz et al., 2011; Welt et al., 2004).

En conclusión, mientras que dos procedimientos, la administración de leptina y el aumento de la temperatura ambiental, reducen la actividad en el modelo ABA, sólo la elevación de la temperatura ambiental tiene efectos beneficiosos en los apartados de ingesta y recuperación de peso. Además, la evidencia a favor de la elevación de la temperatura ambiente en pacientes con anorexia nerviosa es indudable.





OBJETIVOS





En el capítulo primero de introducción teórica se han descrito dos procedimientos experimentales para estudiar la anorexia nerviosa, los cuales se conocen por las siglas ABA y SIH (Broocks et al., 1990; Epling et al., 1991). Ambos consisten en permitir el acceso a una rueda de actividad y restringir la alimentación, lo que produce pérdida de peso, un aumento excesivo de la actividad y disminución de la ingesta. Además, nos hemos centrado en la exposición de dos formas de revertir la hiperactividad, la elevación de la temperatura ambiente y la administración de leptina.

La manipulación de la temperatura ambiente no solo evita y revierte el desarrollo de la actividad excesiva en el procedimiento ABA, sino que también logra efectos beneficios sobre el aumento del peso corporal y de la ingesta (Gutiérrez et al., 2009; Gutiérrez et al., 2006; Gutierrez et al., 2008). Por otro lado, la leptina únicamente ha conseguido revertir la hiperactividad sin ningún efecto sobre el peso y la ingesta (Exner et al., 2000; Hillebrand et al., 2005b; Verhagen et al., 2011).

Mientras que el efecto de la leptina se ha estudiado en ambos modelos animales, el aumento de la temperatura ambiente solo ha sido probada en el modelo ABA. Así, el planteamiento experimental que se va a desarrollar a continuación tiene como primer objetivo estudiar el efecto del calor sobre las consecuencias del procedimiento SIH. Un segundo objetivo fue analizar la eficacia comparativa de cada uno de los tratamientos, calor y administración de leptina exógena.

Por otro lado, conocidos los beneficios de la elevación de la temperatura ambiente en el modelo ABA, un último objetivo fue conocer los mecanismos por los cuales la manipulación de la temperatura ambiente ejerce los cambios comportamentales, centrándonos en la implicación de AMPK como modulador tanto del proceso de deterioro como del de recuperación.

En resumen, los objetivos de la presente Tesis Doctoral fueron:

1. Estudiar el efecto del calor sobre las consecuencias del procedimiento SIH
2. Estudiar la eficacia comparativa de la administración de leptina y la aplicación de calor sobre las consecuencias del procedimiento SIH
3. Estudiar la posible implicación de AMPK como modulador del proceso de deterioro en el modelo ABA y en la reversión con calor



CAPÍTULO SEGUNDO

Material y método





1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y CUIDADOS

Todos los procedimientos experimentales realizados en esta tesis doctoral fueron aprobados por Comité ético de uso y cuidado de los animales de la Universidad de Santiago de Compostela, bajo la responsabilidad de Emilio Gutiérrez García y registrados con el número de licencia: 15004/17/002. Dichos procedimientos se han realizado bajo el amparo del marco legislativo vigente:

- Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, del 22 de septiembre, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.
- Ley Estatal 32/2007, del 7 de noviembre, para el cuidado de los animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.
- Real decreto 53/2013, del 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.
- Decreto 296/2008, del 30 de diciembre, de protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia, y por el que se crea el Registro de los centros de cría, de suministradores y usuarios y la Comisión Gallega de Bienestar de los Animales de Experimentación.

Durante la realización de esta tesis doctoral se tuvo en cuenta el principio de las tres erres que se establece en el Artículo 4 del Real Decreto 53/2013 (Principio de reemplazo, reducción y refinamiento). En base a estos principios, se procuró emplear el menor número de animales posible para alcanzar los objetivos y minimizar el dolor, angustia y estrés, maximizando en la medida de lo posible el bienestar animal.

Todos los procedimientos realizados con animales se llevaron a cabo en el centro usuario ANIMALARIO EXPERIMENTAL FACULTAD DE BIOLOGÍA de la Universidad de Santiago de Compostela cuyo número de registro REGA es el siguiente: ES 150780263301.

Los animales utilizados para el desarrollo de esta tesis doctoral fueron ratas macho común (*Rattus Novergicus*) de la cepa Sprague-Dawley que fueron adquiridas en el Animalario General de la Universidad de Santiago de Compostela, con una masa corporal comprendida entre los 140 y 190 gramos de peso y las 6-7 semanas de vida.

A su llegada al estabulario, los animales fueron alojados comunalmente (no más de cuatro animales por caja) con comida y agua ad libitum, siendo el ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, de 8:00 a 20:00 h y a una temperatura ambiente de $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Durante todo el tiempo que los animales permanecen en el laboratorio se verificó su correcto bienestar tanto físico, a través de la monitorización del peso corporal y la ingesta de comida y agua, aspecto del pelaje, la posición corporal, ect, como conductual, poniendo atención ante la posible presencia de comportamientos estereotipados, ausencia de aseo corporal, agitación, aletargamiento, etc.

2. PROCEDIMIENTOS NO QUIRÚRGICOS

2.1. MONITORIZACIÓN DE LA INGESTA Y EL PESO CORPORAL

En función de los requerimientos experimentales la determinación del peso corporal de los animales y de su ingesta se realizó diariamente o cada dos días. Para el peso corporal y el agua se dispuso de una balanza con un rango de medida entre los 0 y los 1000 gramos, mientras que para la comida se utilizó una balanza más sensible con un rango de 0 a 100 g. La ingesta de comida se calculó pesando la comida en el caso de los animales con alimentación ad libitum, cada 24 horas, mientras que en el modelo ABA fue tras el período de alimentación de 1.5 horas. El pesado del animal y las botellas de agua se realizó siempre a la misma hora, entre las 10:30 y las 11:00 h.

2.2. MANIPULACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL

Se manipuló el estado nutricional de los animales a través de dos tipos de restricción de alimentos: bien temporal de hora y media, en el cual los animales tienen acceso a una cantidad suficiente de comida (en torno a los 70 gramos), o bien de cantidad (el 60% de lo consumido anteriormente ante una situación ad libitum). La duración de la restricción temporal de comida se realizó, para el modelo ABA, hasta un máximo de 14 días o hasta que el animal perdió un 25% de su peso corporal inicial, justo antes del comienzo de la restricción. Para el modelo SIH, la duración de la restricción en la cantidad de comida fue de un máximo de 7 días o hasta que el animal perdió un 25% de su peso corporal inicial.

2.3. MONITORIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD EN LA RUEDA

Se trata de un registro no invasivo de la actividad en una rueda de ejercicio por medio de un conmutador magnético que monitoriza de forma automática las vueltas que el animal da en la rueda, situada al lado izquierdo de la caja de alojamiento. Los datos de actividad del animal se registran cada minuto y se envía a un ordenador al cual está conectada la rueda.

2.4. MONITORIZACIÓN DE LA TEMPERATURA CORPORAL

La determinación de la temperatura corporal se realizó por biotelemetría mediante un transpondedor GE2-Mitter insertado subcutáneamente en la zona peritoneal.

2.5. MEDICIÓN DE LA TEMPERATURA DEL BAT

Para la obtención de las imágenes de la temperatura del BAT se empleó una cámara térmica que permite registrar la radiación infrarroja de la zona interescapular de cada animal (B335 Compact-Infrared-Thermal-Imaging-Camera, FLIR, West Malling, Kent, UK). Para poder conseguir esta imagen se colocó la cámara a 50 cm del animal previamente rasurado y se sacaron imágenes con un rango de temperatura entre 26°C y 39°C. Debido a que el pelaje es necesario para el aislamiento térmico y que los animales con los que trabajamos pueden padecer

de hipotermia, el rasurado del pelo se realizó el día en que tienen que ser sacrificados. Este procedimiento se realizó con una máquina eléctrica cuyo ruido supone un estrés para los animales que puede afectar a la temperatura del BAT, por lo que se esperó una hora antes de quitar la foto para que el animal se pudiera tranquilizar. Además, en el caso de los animales alojados a 32°C, esta hora permite que los animales se aclimaten a una temperatura ambiente de 21°C y así eliminar el posible ruido que pueda causar una temperatura ambiental elevada. El análisis de las imágenes se hizo a través de un software específico suministrado por la casa comercial (FLIR-Tools-Software, FLIR, West Malling, Kent, UK).

2.6. PREPARACIÓN DE MINIBOMBAS OSMÓTICAS

Para la administración crónica de sustancias se utilizaron minibombas osmóticas (modelo 2001; Alzet Osmotic Pumps Corp, Cupertino, CA, USA) alojadas subcutáneamente en la zona interescapular, las cuales se rellenaron con una aguja y una jeringuilla para este fin específico en un ambiente estéril bajo campana. Para su activación y correcta liberación de las sustancias se colocaron en un baño a 37°C durante toda la noche, o bien un mínimo de 6 horas antes de su implantación en el animal.

3. PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS

3.1. ANESTESIA Y ANALGESIA (VÍAS DE ADMINISTRACIÓN)

Antes de cualquier procedimiento quirúrgico se indujo una anestesia general a los animales. La composición de la anestesia fue de 42.5% de ketamina (Imalgene 1000 inyectable, *Merial*, Barcelona, España), 20% xilazina (Rompún 2%, Bayer Health Care, Berlin, Alemania) y 37,5% de suero salino fisiológico (Suero fisiológico isotónico, Physan, Madrid, España), y la dosis utilizada fue de 200µl/100 gramos de masa corporal. Para comprobar el estado de anestesia de cada individuo se comprobó el reflejo podal y palpebral, de tal forma que su ausencia es indicativa de que puede llevarse a cabo el procedimiento quirúrgico. Después de cada procedimiento quirúrgico los animales son tratados con ketoprofeno (ketoprofeno-Orudis 100 mg, *Sanoli aventis*, Barcelona, España) como medida de analgesia, administrando 2,5 mg por kg de masa corporal.

La anestesia fue administrada por vía intraperitoneal (IP), es decir, en la parte ventro-caudal de la rata por debajo del peritoneo. Para ello se coge al animal por la espalda con la ayuda de un trapo y se le inmoviliza intentando oprimirle las extremidades anteriores. Se inclina la cabeza ligeramente hacia abajo para evitar desgarrar vísceras y se inserta la aguja (BD Microlane, 25G 5/8" 0.5x16mm, *BD Medical Surgical Systems*), la cual está acoplada a una jeringa (1 mL BD slip-tip syringe, bulk, non-sterile, *BD Medical Surgical Systems*), de forma perpendicular al animal, con una profundidad de medio centímetro y un ángulo de 30°, preferiblemente en su costado derecho.

El ketoprofeno se administró por vía subcutánea (SC) en la zona dorso-caudal del animal, por encima de la pata posterior. Se inmoviliza al animal con un trapo cubriéndole la cabeza, se pellizca el lomo con la misma mano y con la otra se introduce la aguja paralelamente a la columna vertebral.

3.2. IMPLANTACIÓN DE TELEMETRÍA

Para la implantación de un transmisor de temperatura corporal (G2 E-Mitter; Respirationics Mini Mitter Inc.) se anestesió el animal y tras una incisión de un centímetro en la piel del abdomen se crea un bolsillo en el cual se insertó el transmisor, de un centímetro de largo y un gramo de peso, para posteriormente cerrar el corte con seda quirúrgica. Tras la cirugía, y para verificar el bienestar de los animales, estos fueron alojados individualmente durante siete días y se monitorizó diariamente la ingesta, el consumo de agua y el peso corporal, además de realizar una valoración de la herida y el aspecto físico y conductual del animal. Al realizar todas estas valoraciones los animales son acostumbrados al manejo del personal de laboratorio y por lo tanto se reduce el posible estrés generado durante el procedimiento experimental

3.3. IMPLANTACIÓN DE MINIBOMBAS OSMÓTICAS

Las minibombas osmóticas son implantadas bajo anestesia general. Se realizó una incisión de un centímetro en la piel de la zona lumbar y se creó un bolsillo en el que se insertó la minibomba osmótica que fue cerrado con seda quirúrgica. Después de esta cirugía se realizaron las mismas comprobaciones del estado físico y conductual del animal que cuando se implantó el transmisor de telemetría.

3.4. DISECCIÓN Y EXTRACCIÓN DE TEJIDOS

Al finalizar cada experimento, los animales fueron anestesiados y sacrificados mediante decapitación para la extracción de tejidos, que fueron congelados en hielo seco o nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta su utilización.

Para la disección de diferentes núcleos hipotalámicos se colocó el cerebro del animal semi-descongelado en una matriz acrílica para cerebro de rata adulta (Kent-Scientific Corporation, # RBMA-300C, EE. UU.) con el hipotálamo hacia arriba y se cortó en una sección coronal de 2 mm de espesor, tal y como se describe en Seoane-Collazo & López (2018). El núcleo arqueado, ventromedial y lateral fueron seccionados según las coordenadas del atlas cerebral de rata de Paxinos & Watson (2013).

4. DISEÑOS EXPERIMENTALES

4.1. MODELO DE ANOREXIA BASADA EN LA ACTIVIDAD (ABA)

Una vez que han transcurrido los siete días de recuperación tras la cirugía para la implantación del transmisor de telemetría, el procedimiento ABA se inicia (Día 0) después de la monitorización del peso de los animales con la retirada de la comida a las 12:30 horas y la apertura de las puertas de acceso a la rueda. Por su parte, los grupos de control sujetos al mismo programa de alimentación para los cuales la rueda de actividad se mantuvo bloqueada durante todo el experimento, se denominan Grupo de Control Inactivos (en contraposición a los animales sujetos al procedimiento estándar ABA, que son Activos). Desde el Día 1 en adelante todas las ratas recibieron la comida de 11:00 a 12:30 horas, período en el que se impidió el

acceso a las ruedas. La ingesta diaria de comida se calcula pesando la comida al inicio y al final de cada periodo de alimentación y la temperatura ambiental del laboratorio se estableció en $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (temperatura estándar). El procedimiento ABA (animales activos) se mantuvo vigente hasta que los animales perdían el 20% de su peso corporal inicial el Día 0. Una vez que los animales alcanzaron este Criterio de pérdida de peso (CPP 20%), las ratas fueron asignadas a una de dos condiciones de temperatura ambiental: temperatura ambiente elevada a $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (AC32), o bien temperatura ambiental estándar a $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (AC21). Debido a que los animales alcanzan el criterio de pérdida de peso del 20% en días diferentes del experimento, se controló este aspecto asignando el primer animal en alcanzar el criterio a la condición de temperatura elevada a 32°C , el segundo animal fue asignado a una temperatura estándar de 21°C , el tercero nuevamente a 32°C , y así sucesivamente.

El experimento terminó bien cuando las ratas alcanzaban el criterio de retirada 75% del peso respecto al Día 0. O bien cuando alcanzaban el criterio de recuperación, peso corporal en el Día n es mayor que el peso corporal en el Día $n-4$, tal y como se establece habitualmente para el procedimiento ABA. La duración total del experimento se estableció en 15 días, ya que es tiempo suficiente para que la mayoría de los animales alcancen uno de los dos criterios.

Por otro lado, los animales inactivos se mantuvieron a una temperatura ambiente de 21°C durante seis días, tiempo que se corresponde con la mediana de días que tardan los animales activos en alcanzar el criterio de pérdida de peso del 20%. Transcurrido este tiempo, las ratas inactivas también fueron asignadas a las mismas dos condiciones de temperatura ambiente, 21°C y 32°C . Las ratas asignadas a la condición de 21°C continuaron así durante tres días más (mediana de días que tardan las ratas Activas 21°C en alcanzar el criterio de retirada), permaneciendo un total de nueve días en experimento. Mientras las ratas asignadas a la condición de 32°C permanecieron con la temperatura elevada durante seis días (mediana de días que tardan las ratas Activas 32°C en alcanzar el criterio de recuperación), por lo que el experimento para ellas tuvo una duración de doce días.

El peso corporal y la ingesta de todos los animales se monitorizó diariamente entre las 10:30 y las 11:00 h, mientras que la actividad en la rueda y la temperatura corporal se registró minuto a minuto a través del sistema informático de adquisición de datos Vital View (Respironics, Mini Mitter Inc.)

4.2. MODELO DE HIPERACTIVIDAD INDUCIDA POR SEMI-INANICIÓN (SIH)

El procedimiento SIH se inicia una vez transcurridos los siete días de recuperación tras la cirugía para la implantación del transmisor de telemetría. Las ratas fueron pesadas y trasladadas a las cajas con ruedas de actividad para entrar en la primera fase del experimento, Ad Libitum (AL). Durante dicha fase las ratas tienen acceso a la rueda y a la comida 24 horas. La temperatura ambiental se situó en $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (temperatura estándar), y el peso corporal y la ingesta de los animales se monitorizó diariamente entre las 10:30 y las 11:00 h, mientras que la actividad en la rueda y la temperatura corporal se registró minuto a minuto a través del sistema informático de adquisición de datos Vital View (Respironics, Mini Mitter Inc.), al igual que en procedimiento ABA. Esta fase AL tiene una duración de 28 o 14 días en función de las necesidades de la investigación.

La segunda fase, de restricción de alimento (RA), comienza cuando las ratas son sometidas a una restricción del 60% del alimento consumido la semana anterior junto con la

administración de los diferentes tratamientos para prevenir hiperactividad: la infusión de leptina o vehículo a través de minibomba osmótica subcutánea y la elevación de la temperatura ambiental a 32°C.

En función de las necesidades experimentales se modificaron aspectos del procedimiento tales como la temperatura ambiente, la dosis de leptina, el origen animal de la leptina, el tipo de alimentación (ad libitum vs restrictiva) o la duración de la fase ad libitum.

5. TÉCNICAS ANALÍTICAS

5.1. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

La técnica de western blot permite la identificación y cuantificación de los niveles de proteína en diferentes tejidos y se compone principalmente de tres etapas: la separación de la proteína por tamaño (electroforesis), la transferencia a un soporte sólido y el marcado de la proteína diana utilizando un anticuerpo primario y secundario (Mahmood & Yang, 2012). A continuación, se detallan todos los pasos a seguir desde la extracción de proteína de un tejido procedente del animal hasta la cuantificación de la proteína de interés de una imagen fotográfica.

5.1.1. Extracción de proteína

Para evitar la degradación de la proteína contenida en el tejido a analizar se debe trabajar durante todo el proceso de extracción con las muestras sobre hielo. Se corta una porción de las muestras de tejido conservadas -80°C y se mete en un tubo eppendorf de 2 mL con cierre de seguridad (Safe-Lock Tubes 2.0 mL, *Eppendorf*, Hamburgo, Alemania). A continuación, se añade el volumen apropiado de tampón de lisis (Tabla 3) para cada tejido en cuestión, el cual puede variar entre 200 µL y 1000 µL, junto con un inhibidor de proteasas (Complete TM, *Roche*, Mannheim, Alemania) y una bola de acero y se homogeneizaron las muestras por un proceso de disgregación y rotura celular que se lleva a cabo en un homogeneizador mecánico (*Tissue lyser II*, *Quiagen*, Germantown, MD, USA) durante 5 minutos a 28Hz. Después las muestras son centrifugadas a 13200 rpm y a 4°C durante 30 min (en tejidos como WAT y BAT, se realizó una centrifuga previa de 5 minutos para que la proteína quedase más limpia de grasa) y se retiró el sobrenadante a otro eppendorf descartando el precipitado.

Tampón de lisis (pH 7.5)	
Tris-HCl pH 7.5	2.5 mL
EGTA (0.2 M, pH 8)	2.5 mL
EDTA (0.2 M, pH 8)	2.5 mL
Tritón X-100	5 mL
Ortavanadato Sódico (0.1 M)	5 mL
Fluoruro Sódico	1 g
Pirofosfato Sódico	1.1 g
Sacarosa	46 g
Cóctel inhibidor de proteasa (Roche)	1 pastilla/50 mL

Tabla 3. Composición del tampón de lisis

5.1.2. Cuantificación del extracto de proteína

Una vez que se obtuvo la proteína del tejido se procedió a determinar la cantidad de proteína presente en el sobrenadante. Para ello se empleó el método colorimétrico descrito por Bradford (1976), utilizando el kit *Bio-Rad Protein Assay (Protein Assay Dye Reagent, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)*. Para ello se prepararon alícuotas de cuantificación en las cuales se añadió 10 μ l del homogeneizado de cada muestra en 250 μ l de agua destilada y se vorteo para mezclar adecuadamente. También se necesitó una curva patrón de ser-albúmina bovina (BSA; *Albumin bovine fraction V powder, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*) con diluciones seriadas a partir de la máxima concentración de 1 mg/mL: 0.03125; 0.0625; 0.125; 0.25; 0.7 y 1 mg/ml.

En una placa de 96 pocillos (*Multiskan Go Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA*) se cargan por duplicado, 10 μ l de cada punto de la curva patrón de menor a mayor concentración y 10 μ l de las alícuotas de cuantificación de cada muestra. Posteriormente se agrega a cada pocillo 250 μ l de solución Bradford en una dilución 1:4 y se mide en un espectrofotómetro, previa incubación a 37°C durante 5 minutos, a una longitud de onda de 595 nm. A partir de la extrapolación de los valores de la recta de calibrado se determinó la concentración de proteína de cada muestra.

5.1.3. Preparación de las muestras para la electroforesis SDS-PAGE

Una vez conocida la concentración de proteína presente en cada muestra homogeneizada se calcularon las proporciones de muestra, tampón de carga 1x (Tabla 4) y tampón de lisis con inhibidor de proteasa, necesarias para la preparación de las alícuotas que después van a ser cargadas en los geles de acrilamida. En función del tejido a analizar se prepararon alícuotas de carga con diferentes concentraciones de proteína, las cuales deben tener la misma concentración final en el volumen de carga de la electroforesis (16 μ l). Así, para el análisis proteico de núcleos hipotalámicos y BAT se utilizó una concentración de 10 μ l/16 μ l, mientras que para hígado y músculo se utilizó una concentración de 20 μ l/16 μ l.

Tampón de carga 5X (pH 6.8)	
SDS	2 g
Trizma-base	8 mL
B-mercaptoetanol	1 mL
Azul de bromofenol	4 mg
Glicerol	10 mL
H ₂ O MilliQ	c.s.p 1L

Tabla 4. Composición del tampón de carga 5X

5.1.4. Preparación de los geles

Para poder separar las proteínas se utilizaron geles de electroforesis Tris/glicina SDS-Poliacrilamida en distintas concentraciones en función del su peso molecular. Para su preparado primero se montan los cristales en las carcasas comprobando que no se produce fuga de líquido. Posteriormente se prepararon los geles separadores (Tabla 5) y se vertió en el montaje de los geles para, inmediatamente después, verter isopropanol 60% en la superficie, lo que nos permitió eliminar las burbujas y nivelar el borde superior. Una vez que los geles polimerizaron se eliminó el isopropanol y se lavó con agua destilada para eliminar el exceso. Por último, se

prepararon los geles concentradores (Tabla 6) y se agregaron sobre los geles separadores e inmediatamente se colocaron los peines que forman los pocillos. Una vez polimerizados se extraen para poder cargar la proteína.

Gel separador	6%	8%	10%
H ₂ O destilada	5.3 mL	4.6 mL	4 mL
Acrilamida/bisacrilamida 30%	2 mL	2.7 mL	3.3 mL
1.5M Tris (pH 8.8)	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
SDS 10%	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL
APS 10%	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL
TEMED	8 µl	6 µl	4 µl

Tabla 5. Composición de los geles separadores de acrilamida en función de su porcentaje.

Gel concentrador 4%	
H ₂ O destilada	3.4 mL
Acrilamida/bisacrilamida 30%	0.83 mL
1.5 Tris (pH 6.8)	0.63 mL
SDS 10%	50 µl
APS 10%	50 µl
TEMED	5 µl

Tabla 6. Composición del gel concentrador 4%.

5.1.5. Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis es el proceso a través del cual las proteínas son separadas en función de su peso molecular. En primer lugar, se colocaron los cristales con los geles en las carcasas de electroforesis, se introdujeron en una cubeta para este fin y se agregó el tampón de electroforesis 1X, que consta de 100 ml de tampón de electroforesis 5X (Tabla 7) en 400 ml de agua destilada, de manera que los geles quedaron sumergidos. En segundo lugar, se incubaron las muestras (alícuotas de carga) a 95°C durante 10 minutos y se cargaron los pocillos de los geles con 16 µl de muestra a partir del segundo pocillo, ya que en el primero se cargó 5 µl del marcador de peso molecular (Precision Plus Protein, cat 161-0374 Bio-Rad). Por último, se cerró la cubeta con una tapa con electrodos que se conectaron a una fuente de alimentación con un voltaje constante de 140V.

Tampón de running 5X	
Glicina	72 g
Trizma-base	15 g
SDS	5 g
H ₂ O	c.s.p 1L

Tabla 7. Composición del tampón de running 5X.

5.1.6. Transferencia semihúmeda

Una vez terminada la electroforesis y las proteínas fueron separadas, estas se transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF, Immobilon-P membrane, Millipore, Burlington, MA, USA). El proceso de transferencia del gel a la membrana se realiza en un soporte horizontal, Trans-blot Semy-dry Transference, que es dependiente de voltaje. Se

colocó la membrana de PVDF sobre un papel absorbente (Extra thick Blot Paper, Bio-Rad), previamente sumergido en tampón de transferencia 1X (Tabla 8), sobre ella el gel, y por último otra capa de papel absorbente sobre todos ellos, eliminando en cada paso las burbujas de aire. Para el correcto funcionamiento de la transferencia semi-seca, las membranas de PVDF fueron previamente activadas con metanol durante 4 minutos y 5 minutos en tampón de transferencia 1X, con un lavado con agua destilada de 5 minutos entre ambos. Se cerró el Trans-blot y se conectó a una fuente de alimentación manteniendo el amperaje constante a 0.25A durante aproximadamente 1.40 horas.

Tampón de transferencia 25X		Tampón de transferencia 1X	
Glicina	36.5 g	Tampón de transferencia 25X	40 mL
Trizma-base	72.5 g	Metanol	200 mL
SDS	4.5 g	H ₂ O destilada	c.s.p 1L
H ₂ O	c.s.p 500 mL		

Tabla 8. Composición del tampón de transferencia 25X y 1X.

5.1.7. Inmunodetección de proteínas

El siguiente paso fue incubar las membranas, que ya contienen las proteínas, con una solución de BSA al 3% disuelto en tampón de lavado (Tabla 9) durante una hora, en agitación y a temperatura ambiente, para bloquear la unión de proteínas a la membrana en zonas que hayan quedado libres tras la transferencia. A continuación, ayudados por los marcadores de peso molecular, se cortó la membrana en distintas porciones que permitieron la detección de varias proteínas en una misma membrana. Cada fragmento se incubó en agitación con el correspondiente anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo (Tabla 10), bien durante una hora a temperatura ambiente, o bien durante toda la noche a 4°C. Después se retira el anticuerpo primario y se realizaron 3 lavados, de 5 minutos cada uno, con TBS-TWEEN (Tabla 9) para eliminar el exceso. Para poder detectar la proteína y amplificar la señal del anticuerpo primario se realizó otra incubación con anticuerpo secundario, también diluido en tampón de bloqueo (Tabla 10), durante una hora en agitación y a temperatura ambiente. El tipo de anticuerpo secundario dependió del tipo de huésped en el que se generó el anticuerpo primario. Por último, se realizaron otros tres lavados de 5 minutos con TBS-TWEEN para eliminar el exceso.

Tampón de lavado 10X (pH 7.6)		Tampón de lavado 1X	
Trizma-base	24.2 g	Tampón de lavado 10X	100 mL
NaCl	80 g	Tween 20	1 mL
H ₂ O destilada	c.s.p 1L	H ₂ O destilada	c.s.p 1L

Tabla 9. Composición del tampón de lavado 10X y 1X.

Anticuerpo	Casa comercial	Dilución
ACC α	Millipore; Billerica, MA, USA	1:1000
pACC	Cell Signaling; Danvers, MA, USA	1:1000
pAMPK α	Cell Signaling; Danvers, MA, USA	1:2000
FAS	BD; Franklin Lakes, NJ, USA	1:1000
CPT1c	SCBT; Dallas, Texas, USA	1:1000
UCP-1	Abcam; Cambridge, UK	1:10000
GRP78	Cell Signaling; Danvers, MA, USA	1:1000
CHOP	SCBT; Dallas, Texas, USA	1:1000
pPERK	SCBT; Dallas, Texas, USA	1:1000
pIKK α /B	SCBT; Dallas, Texas, USA	1:1000
IL-6	Abcam; Cambridge, UK	1:500
IL1- B	Abcam; Cambridge, UK	1:1000
B3-RA	Abcam; Cambridge, UK	1:1000
β -actina	Sigma-Aldrich; St.Louis, MO, USA	1:5000
α -tubulina	Sigma-Aldrich; St.Louis, MO, USA	1:5000

Tabla 10. Relación de anticuerpos usados y su dilución

5.1.8. Revelado y fijación de la señal

La detección de proteínas se logró con el revelado de la membrana con reactivos de quimioluminiscencia mejorada, ECL (*Pierce ECL Western Blotting Substrate*, Cultiab). Para ello, las membranas fueron incubadas en este sustrato de revelado en una dilución 1:1 durante 5 minutos en oscuridad, ya que la solución es fotosensible. Posteriormente se colocaron los fragmentos en un casete de revelado (*HyperCassette*, Amersham Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido) entre papel acetato transparente y evitando las burbujas de aire. El revelado de las membranas se realizó en una sala oscura destinada a tal fin y se introdujo una hoja de revelado (*FujiMedical X-Ray Film Super RX*, Fujifilm Corporation, Tokio, Japón) sobre las membranas y se cerró el casete. Se dejó exponer la señal quimioluminiscente durante el tiempo apropiado en función de la proteína, se retiró la película y se sumergió en una solución reveladora (*G150, Developer/Replenisher*, Agfa-Gevaert Group, Dubendorf, Suiza) hasta que se visualizó la señal y en ese momento se sumergió en líquido fijador (*G354, Manual Fixing Bath*, Agfa-Gevaert Group, Dubendorf, Suiza). Por último, las películas fueron lavadas en agua para eliminar el exceso de fijador y puestas a secar.

5.1.9. Cuantificación de la señal

La cuantificación de la señal se realizó mediante la medición de la densidad óptica de la señal de cada muestra, a partir de imágenes escaneadas (resolución 400 ppp, CanonScan 9900F, Canon, Tokio, Japón) de las películas autorradiográficas, con el software informático ImageJ (*ImageJ 1.40g*, Wayne Rasband, NIH, USA). Cada medición de densidad óptica se corrigió por la medición de la densidad óptica de una región adyacente a la señal de las muestras (blanco).

5.2. ANÁLISIS DE RNA MENSAJERO POR PCR EN TIEMPO REAL

5.2.1. Extracción de RNA

Para evitar la degradación del RNA se realizó todo el procedimiento de extracción sobre hielo. Se cortó una porción del tejido a estudiar y se homogeneizó mecánicamente en 1 mL de Trizol (*TRIZOL Reagent*; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), junto con una bola de acero, durante

5 minutos (con el mismo sistema empleado para extracción proteica) a 28Hz. Después, se centrifugaron a 4°C las muestras durante 10 minutos a 13200 rpm y se recogió la fase intermedia que se llevó a un nuevo eppendorf estéril. A continuación, se realizaron una serie de pasos para llevar a cabo el aislamiento del ARN:

- Añadir 250 µl de cloroformo (*Chloroform*, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) y agitar en un vórtex durante 15 segundos, asegurándonos de que se mezclaba correctamente.
- Dejar reposar durante 3 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar durante 15 minutos a 4°C y 13200 rpm. Con este centrifugado se obtienen varias fases: una superior acuosa, donde se encuentra el RNA, otra inter-fase con ADN, y una inferior orgánica con proteínas y lípidos. La que nos interesaba era la fase superior que contiene RNA, por lo que es aspirada y llevada a otro tubo eppendorf estéril.
- Añadir 500 µl de 2-propanol y agitar en un vórtex, asegurándonos de que se mezcla bien.
- Dejar reposar las muestras 10 minutos a -20°C: esto favoreció la precipitación del RNA.
- Centrifugar durante 10 minutos a 4°C y 13200 rpm

Una vez finalizada esta última centrifuga se observó si había precipitado, se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 mL de etanol (*Ethanol absolute PA*, Applichem/Panreac, Darmstadt, Alemania) al 70% en agua DEPC para lavar el precipitado. Se agitó y mezcló bien en un vórtex y se centrifugó durante 5 minutos a 4°C y 13200 rpm. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante volcándolo en un recipiente y con cuidado de que no se desprendiese el pellet de RNA. Para eliminar por completo el posible etanol residual se centrifugó durante un 1 minuto las muestras a máxima velocidad y se aspiró el etanol con una pipeta. Finalmente, se resuspendió el pellet en agua DEPC y se calentó a 60°C durante 10 minutos para facilitar su disolución.

5.2.2. Cuantificación de RNA

Una vez que se obtuvo el RNA del tejido se procedió a determinar su concentración y pureza a través de un espectrofotómetro (NanoDrop, 2000) a dos longitudes de onda: 260 nm, que indicó la cantidad de ácidos nucleicos, y 280 nm, que indicó la cantidad de proteína. El grado de pureza se observó estudiando la ratio 260/280, considerando aceptable la oscilación entre 1.4 y 1.8.

Conocida la concentración de RNA y pureza de nuestras muestras, estas fueron normalizadas a una misma concentración de 500 ng/µl para BAT, WAT, núcleos hipotalámicos y músculo.

5.2.3. Retrotranscripción (RT)

El siguiente paso fue amplificar el ARN extraído en forma de ADN complementario a través de la retrotranscripción (RT). Esta se realizó en un volumen final de 30 μ l y cuyos componentes y proporciones se especifican en la Tabla 11. A parte de las muestras también se incluye un control negativo (RT⁻) que consta de 30 μ l de reacción, excepto M-MLV, que fue sustituido por agua MilliQ. Entonces, las mezclas fueron incubadas en un termociclador con los siguientes parámetros: 50 minutos a 37°C, 15 minutos a 42°C y 5 minutos a 95°C. Al terminar la Retrotranscripción las muestras se mantuvieron a 4°C o fueron congeladas a -20°C hasta su uso.

Reactivo	Casa comercial	Cantidad (μ l)	Composición	
Tampón de reversotranscripción (5X first strand buffer)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	6	Tris-HCL (pH 8.3)	250 nM
			KCl	375 nM
			MgCl	15 mM
			DDT	50 nM
Mg ₂ Cl (50 mM)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	1.5		
Mezcla de dNTPs	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	6	dTTP	10 mM
			dCTP	10 mM
			dGTP	10 mM
			dATP	10 mM
Random primers	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	0.17		
Inhibidor de RNasa (RNaseOUT, 40 U/ μ l)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	0.25		
m-MLV reversotranscriptasa (200 U/ μ l)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	1		
H ₂ O DEPC		c.s.p	Dietilpirocarbonato	0.1%
		30	H ₂ O destilada	c.s.p 1L

Tabla 11. Componentes de la reacción de Retrotranscripción (RT).

5.2.4. PCR en tiempo real

Por último, para determinar los niveles de ARNm en los genes de interés mediante PCR a tiempo real, se utilizó el equipo 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) a través del sistema de detección de sondas *TaqMan*. Este método utiliza sondas específicas marcadas con fluorocromos, donador y aceptor, y está basado en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) entre los dos fluorocromos. El fluorocromo empleado para la PCR fue TAMRA, el cual posee un máximo de emisión de 580 nm y los primers usados fueron diseñados con el programa Primer Express (*Applied biosystems*, Foster City, CA, USA) y posteriormente cotejados en la base de datos BLAST.

El volumen final de la mezcla para la reacción de PCR fue de 12 μ l y sus componentes y proporciones se especifican en la Tabla 12.

Reactivo	Casa comercial	Cantidad (µl)
H2O MilliQ	---	2.92
Cebador directo (10 µM)	Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania	0.36
Cebador inverso (10 µM)	Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania	0.36
Sonda (5 µM)	Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania	0.36
Taqman Universal PCR master mix	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA	6
Muestra (RT)	---	2

Tabla 12. Componentes y proporciones de la reacción de PCR en tiempo real.

En la placa de medición para la PCR se cargó por duplicado, además de las muestras, un control negativo (RT⁻), un blanco (agua MilliQ) y una curva patrón. La curva patrón consta de 6 puntos realizados en diluciones seriadas, en proporción 1:4, a partir de un volumen total de 30-40 µl procedente de la mezcla de 2 µl de las muestras de RT.

Las condiciones de amplificación fueron de 50°C (2 min), 95°C (10 min), 95°C (15 seg) y 60° (1 min) durante 40 ciclos. Para determinar la concentración de ADN complementario se analizaron los valores CT, que hace referencia al número de ciclos necesarios para que la señal fluorescente supere el umbral definido por los niveles de fondo, siendo inversamente proporcional a la cantidad de ADN complementario.

Para analizar los datos se realizó comparando la ratio entre un gen de referencia (*Hprt*) y el gen problema. Los primers y sondas empleadas en esta tesis doctoral se especifican en la Tabla 13.

mRNA	GenBank		Secuencia
ACCα	NM_022193	Fw	5'-TGGGCGGGATGGTCTCTTT-3'
		Rv	5'-AGTCGCAGAAGCAGCCCATT-3'
		Pb	FAM-5'-ACCTTTGAAGATTTGTCAGGATCTTTGATGA-3'-TAMRA
AgRP	NM_033650.1	Fw	5'-GCACAAGTGCCAGGAAGCTC-3'
		Rv	5'CAGGACACAGCTCAGCAACATT-3'
		Pb	FAM-5'-CAAGGATCAACAAGCAAAGGCCATGC-3'-TAMRA
ATROGINA-1	NM_133521.1	Assay ID	ThermoFisher Taqman Gene Expression Assays Assay ID Rn01504258_m1
CART	NM_017110.1	Fw	5'-GGACATCTACTCTGCCGTGGAT-3'
		Rv	5'-GCGCTTCAATCTGCAACACA-3'
		Pb	FAM-5'-TCCCATGAGAAGGAGCTGCCAAGGC-3'-TAMRA
C/EBPα		Fw	5'-GTGCGTAAGAGCCGAGATAA-3'
		Rv	5'-TGGTCAACTCCAACACCTTCTG-3'
		Pb	FAM-5'-AAACAGCGCAACGTGGAGACGCA-3'
C/EBPB		Fw	5'CAGAGTAGCCCCCTTGCTTTTGG-3'
		Rv	5'-GGATTGCAGGTCAGACACAGAA-3'
		Pb	FAM-5'-TGAGGATAGCCAGGTCAAAGCCCA-3'
CIDEA	NM_001170467	Assay ID	ThermoFisher TaqMan Gene Expression Assays Assay ID Rn04181355_m1
CPT1B	NM_013200.1	Assay ID	Applied Biosystems TaqMan Gene Expression Assays Assay ID Rn00566242_m1
FAS	NM_017332	Fw	5'-GACATTTTCATCAGGCCACC-3'
		Rv	5'-CCTTAGCAGCCGCACCTC-3'
		Pb	FAM-5'-CTGCCAGGACAGGAACCG-3'-TAMRA
HPRT	NM_012583	Fw	5'-AGCCGACCGTTCTGTCAT-3'
		Rv	5'-GGTCATAACCTGGTTCATCATCAC-3'
		Pb	FAM-5'-CGACCCTCAGTCCCAGCGTCGTGAT-3'-TAMRA
HSL	NM_012859	Fw	5'-CCAAGTGTGTGAGCGCCTATT-3'
		Rv	5'-TCACGCCAATGCCTTCT-3'
		Pb	FAM-5'-AGGGACAGAGACGGAGGACATTTTGACTC-3'-TAMRA

LPL	NM_012598	Fw	5'-CTGAAAGTGAGAACATTCCCTTCA-3'
		Rv	5'-CCGTGTAATCAAGAAGGAGTAGGTT-3'
		Pb	FAM-5'-CCTGCCGGAGGTCGCCACAAATA-3'-TAMRA
MC4R		Fw	5'-CCGAGTGAATACTACGGCTAAAGG-3'
		Rv	5'-GGCGCTACTGAAAGCTCACTCT-3'
		Pb	FAM-5'-CACAAAAACGAACTGCAGACTGGTCAGC-3'-TAMRA
MURF-1	NM_080903.1	Assay ID	ThermoFisher Taqman Gene Expression Assays Assay ID Rn01639111_m1
NPY	NM_012614.1	Fw	5'-CACAGAAAATGCCCCAGAA-3'
		Rv	5'-TCAGGAGAGCAAGTTTCATTTCC-3'
		Pb	FAM-5'-AAGGCTTGAAGACCCTTCCATGTG GTG-3'-TAMRA
PGC1 α	NM_031347	Fw	5'-CGATCACCATATTCCAGGTCAAG-3'
		Rv	5'-CGATGTGTGCGGTGTCTGTAGT-3'
		Pb	5'-AGGTCCCCAGGCAGTAGATCCTCTTCAAGA-3'
PGC1B	NM_176075	Assay ID	Applied Biosystems TaqMan Gene Expression Assays Assay ID Rn00598552_m1
POMC	NM_139326.2	Fw	5'-CGTCCTCAGAGAGCTGCCTTT-3'
		Rv	5'-TGTAGCAGAATCTCGGCATCTTC-3'
		Pb	FAM-5'-CGCGACAGAGCCTCAGCCACC-3'-TAMRA
PPAR γ	NM_013124	Fw	5'-TGGGCCAGAATGGCATCTC-3'
		Rv	5'-CTGATGCACTGCCTATGAGCACTTACA-3'
		Pb	FAM-5'-CTAACTCCAGAAAAGCAAGCAA-3'-TAMRA
PRDM16	XM_008764418	Assay ID	ThermoFisher TaqMan Gene Expression Assays Assay ID Rn01516225_m1
SREBP1	NM_011480	Fw	5'-CTCATCAACAACCAAGACAG-3'
		Rv	5'-TGTTGCCATGGAGATAGCATCTC-3'
		Pb	FAM-5'-ACCAGCTGCATGCCATGGGCAAGTA-3'-TAMRA
UCP1	NM_012682	Fw	5'-CAATGACCATGTACACCAAGGAA-3'
		Rv	5'-GATCCGAGTCGAGAAAAGAA-3'
		Pb	FAM-5'-ACCGGCAGCCTTTTTCAAAGGGTTTG-3'-TAMRA
UCP3	NM_013167	Assay ID	Applied Biosystems TaqMan Gene Expression Assays Assay ID Rn00565874_m1

Tabla 13. Primers y sondas para Real Time PCR.

5.3. DETERMINACIONES SÉRICAS

La sangre es extraída del tronco cerebral de los animales tras la decapitación y fue recogida en tubos específicos (BD Vacutainer; Plymouth, UK) y separada en suero centrifugando a 3200x g durante 15 minutos a 4°C. El suero fue congelado y almacenado a -80°C

El análisis de los diferentes metabolitos se realizó, en el caso de los niveles de T3, T4, colesterol, triglicéridos y glucosa, utilizando un analizador químico automatizado (*ADVIA 2400 Chemistry System*, Siemens Medical Solutions Inc., USA) y sus reactivos específicos. Los niveles de corticosterona, leptina, adrenalina y noradrenalina fueron analizados a través de kit ELISA (ab108821, Abcam, Cambridge, UK, para corticosterona; EZRL-83K, Linco Research St. Charles, Missouri, US, para leptina y EIA-3175, DRG Instruments GmbH, Alemania, para adrenalina y noradrenalina).

5.4. HISTOLOGÍA

Se utilizaron dos técnicas histológicas en muestras de tejido de ratas sometidas al modelo ABA. Para conocer la morfología del tejido adiposo blanco gonadal y para detectar la presencia o ausencia de la proteína UCPI se empleó la tinción con hematoxilina/eosina y la inmunohistoquímica con UCPI. Para detectar el contenido de grasa en el hígado se hizo uso de la Tinción Oil Red. La visualización de los cortes realizados con las tres técnicas se realizó con

un microscopio óptico con cámara digital Olympus XC50 (Olympus Corporation, Tokio, Japón) a 40X. Las imágenes se cuantificaron a través del software ImageJ 1.33 (ImageJ-1.33, Wayne Rasband, NIH, EE. UU.).

5.4.1. Hematoxilina/eosina

Las muestras de tejido parafinadas son cortadas en un micrótopo y estos cortes son tratados con xilol para eliminar los excesos de parafina. Posteriormente pasan por una serie de alcoholes en concentración decreciente (100°, 95° y 70°) para rehidratar las muestras y se lava con H₂O destilada para eliminar el exceso de alcohol. A continuación, se sumergen en hematoxilina durante 10 minutos y de nuevo se hace otro lavado con H₂O destilada para eliminar el exceso y se sumergen rápidamente 30 segundos en eosina. Después se pasa por otra batería de alcoholes, pero esta vez en orden creciente (70°, 95° y 100°), para deshidratar la muestra. Por último, se dejan 10 minutos sumergidos en xilol, antes de realizar el montaje.

5.4.2. Inmunohistoquímica

Se cortó una porción de tejido y se sumergió en formaldehído tamponado al 10% durante 24 horas y posteriormente se deshidrataron a través del paso por diferentes concentraciones de alcohol, permitiendo su estudio histológico, montaje en xileno e inmersión en parafina. Una vez parafinados, los bloques fueron cortados en secciones de 3 µm y se desparafinaron en xileno, se rehidrataron y se lavaron en agua destilada para proceder a la tinción inmunohistoquímica de UCP1 incubando los cortes durante toda la noche con anticuerpo primario (UCP1, dilución 1:500, Abcam, Cambridge, RU). Posteriormente, se lavaron e incubaron con anticuerpo secundario (ENVISION, anti-ratón y anti-conejo de DAKO; Glostrup, Dinamarca).

5.4.3. Tinción Oil Red

Se realizó en porciones de hígado congelados, los cuales son cortados en un criostato en secciones de 10 µm y fueron fijados en formalina neutra tamponada al 10% durante toda la noche. Posteriormente, son sumergidos en Solución Oil Red (*Oil red color solution*, Merck) durante 20 minutos y después se lavan con H₂O destilada para eliminar el exceso. El siguiente paso fue someter las muestras a otro colorante, contratiéndolas con Hematoxilina de Harris (Bio-Optica) durante 10 minutos y tras otro lavado se montan en un medio de montaje acuoso.

5.5. DETERMINACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS, COLESTEROL Y GLUCÓGENO HEPÁTICO

5.5.1. Extracción de grasa hepática

Para extraer los lípidos del hígado se cortan 100 mg de tejido y se homogenizan, siguiendo el mismo procedimiento que en la extracción de proteínas y RNA, con 1 mL de solución 2:1 de cloroformo-metanol. Posteriormente, se mantuvieron las muestras en agitación constante durante 3 horas a temperatura ambiente en un rotador orbital. A continuación, se añadió 300 µl de agua MilliQ, se vorteo para que su correcta mezcla y se centrifugó durante 30 minutos a temperatura ambiente y 13200 rpm. Como resultado de la centrifuga se obtuvieron

una fase superior inorgánica, que fue descartada, y una fase orgánica inferior que contiene los lípidos, la cual se pasó a un nuevo eppendorf estéril. Por último, estos tubos se dejaron evaporar una campana de extracción de gases durante al menos 8 horas, obteniendo de esta forma un precipitado que contiene los lípidos del tejido.

5.5.2. Análisis de triglicéridos y colesterol hepáticos

La determinación de triglicéridos y colesterol se realizó con un kit comercial específico (Spinreact S.A., St. Esteve de Bas, España) mediante la cuantificación colorimétrica en espectrofotómetro. Una vez que se obtiene el precipitado de lípidos se añadió cloroformo, en una cantidad conocida en igual para todas las muestras, y se vorteo para diluir bien el precipitado. A continuación, se transfirieron 15 µl de muestra a un nuevo eppendorf estéril y se dejó evaporar de nuevo para después mezclarlo con el reactivo indicado en el kit y se incubó 5 minutos a 37°C hasta que aparece una coloración roja. La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de triglicéridos o colesterol presente en el precipitado. Por último, se cargó por duplicado una placa con las muestras y la recta patrón, y se leyó en el espectrofotómetro a 505 nm y se calculó la concentración teniendo en cuenta el peso del tejido.

5.5.3. Extracción y análisis de glucógeno hepático

Para evitar la degradación del glucógeno se realizó todo el procedimiento de extracción sobre hielo. Para la extracción del glucógeno hepático se comenzó cortando 10 mg de tejido de cada muestra a las que se le añadió 100 µl de agua destilada y una bola de acero y se homogeneizó siguiendo el mismo proceso que anteriormente. A continuación, se hirvieron en un thermoblock a 100°C durante 5 minutos para inactivar las enzimas. Por último, se centrifugó durante 5 minutos a 13200 rpm y se recogió el sobrenadante, el cual contiene el glucógeno.

Para el análisis del glucógeno hepático se utilizó un kit comercial específico (*Glycogen Assay Kit*, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) mediante la cuantificación colorimétrica en espectrofotómetro y siguiendo las instrucciones del fabricante. En una placa se cargó las muestras y la recta patrón y se leyó en el espectrofotómetro a 570 nm y se calculó la concentración teniendo en cuenta el peso del tejido.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos se presentaron como el valor de la media y la desviación estándar (media ± SEM), en el caso de los datos conductuales, a excepción del peso corporal de las ratas sometidas al procedimiento ABA. Esta variable fue representada en función del porcentaje de peso corporal del día que entraron en experimento (Día 0), aunque los análisis estadísticos se hicieron con los valores brutos en gramos. Por otro lado, los datos moleculares se presentaron como porcentaje en función del control y en algunos casos en sus valores brutos. El tamaño muestral se especifica en cada experimento.

Los análisis estadísticos se realizaron con el Software IBM SPSS Statistics versión 21.0 (IBM Corp. Armonk, NY, EE. UU.) y se especifican en un apartado dentro del capítulo que

trata cada experimento. Se consideraron significativos los resultados que presentaron una $p \leq 0.05$.





DESARROLLO EXPERIMENTAL





CAPITULO TERCERO
Comparación de la eficacia de la leptina y el aumento de la temperatura ambiental en la prevención de la hiperactividad en el modelo SIH



1. INTRODUCCIÓN

Como ya hemos revisado en la Introducción, la investigación con el modelo animal ABA ha puesto sobre la mesa, con abundante soporte experimental (Cerrato et al., 2012; Gutiérrez et al., 2008, 2009; Hillebrand et al., 2005a) una interpretación alternativa que implica directamente a la temperatura ambiental. Este planteamiento considera la hiperactividad como una respuesta adaptativa para compensar la hipotermia derivada de la pérdida de peso. De acuerdo con este planteamiento, la hiperactividad en las pacientes podría ser también una respuesta bio-conductual que estaría modulada por la temperatura ambiental.

Con respecto a la leptina, un estudio fundamental (Exner et al., 2000) con el modelo SIH mostró que la administración periférica de leptina, a través de minibombas osmóticas, fue eficaz tanto para prevenir el aumento de actividad en los animales sometidos a restricción parcial de comida, como para revertir ese aumento de actividad una vez que se había producido. Sin embargo, a pesar de la reducción de la actividad en la rueda, en ninguno de los dos casos esta reducción de la actividad se tradujo en la recuperación del peso corporal en los animales tratados con leptina. También en otro estudio diferente realizado con animales expuestos al modelo ABA la infusión ICV crónica de leptina impidió con éxito el incremento de actividad característica del modelo ABA, aunque las ratas tuvieron que retirarse del experimento debido a tres circunstancias que ponían en peligro la supervivencia de los animales: la hipotermia acompañada de una pérdida de peso sustancial, además de una ingesta de alimentos significativamente menor que los animales infundidos con vehículo (Hillebrand et al., 2005b). Sin embargo, esta ingesta reducida en animales sometidos a un programa de restricción de comida no se evidenció en otro estudio utilizando el modelo con una única administración ICV de leptina en el área tegmental ventral (VTA) que suprimió la actividad en la rueda (Verhagen et al., 2011). También en este mismo estudio se obtuvieron resultados similares cuando se inyectó leptina bilateralmente en esta área hipotalámica.

Con respecto a la hipótesis que vincula el incremento de la actividad en la rueda con los mecanismos implicados en el desarrollo de hipotermia en animales con alimentación restringida, investigaciones anteriores han demostrado que en ratas expuestas a ABA, el suministro de calor fue eficaz en la prevención tanto de la hiperactividad como la pérdida de peso (Gutiérrez et al., 2006; Hillebrand et al., 2005a). En este sentido, el aumento de la temperatura ambiente (TA), además de la reversión de la actividad excesiva, mejoró la ingesta de alimentos y permitió la recuperación del peso corporal. Estos efectos fueron notables ya que el aumento en la TA se retrasó hasta que las ratas habían perdido el 20% del peso corporal y mientras que los animales continuaban expuestos al programa de alimentación restringida de 1.5 h/día y acceso libre a la rueda de actividad. En estas circunstancias, el aumento de la TA permitió una recuperación del 100%, mientras que todos los animales mantenidos a una TA estándar de 21°C tuvieron que ser retirados; un efecto que se ha replicado en animales machos y hembras (Cerrato et al., 2012; Gutiérrez et al., 2008, 2009).

Hasta la fecha, no se han replicado los efectos que la leptina tiene sobre el modelo SIH, y tampoco se ha comprobado la prevención de la hipotermia, por medio del incremento de la TA en animales expuestos al modelo SIH. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue replicar el estudio original realizado por Exner et al., (2000) y comparar la eficacia de la leptina con el aumento de la temperatura ambiente en el modelo SIH.

2. MÉTODO

2.1. SUJETOS

Cuarenta y tres ratas macho Sprague-Dawley, de unas 6-7 semanas de edad y con un rango de peso de 130-150 g, fueron adquiridas en el Animalario Central de la Universidad de Santiago de Compostela (USC). Las ratas fueron alojadas comunalmente a su llegada al estabulario con comida y agua ad libitum, siendo el ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, de 8:00 a 20:00 h. La temperatura ambiente se estableció en $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

2.2. APARATOS

El laboratorio consta de 12 cajas de metacrilato transparente de 48 x 31,5 x 47 cm. En uno de los laterales de cada caja se dispuso una rueda de actividad tipo Wahmann (circunferencia de 1,1 m de desarrollo, superficie de 10 cm de ancho, suelo de rejilla metálica y paredes de metal). En el otro lateral se situó una rejilla metalizada para depositar la comida y una botella de agua. Todas las cajas fueron acondicionadas con virutas de madera.

Las ruedas se introdujeron en cajas incubadoras de madera ($60 \times 60 \times 60 \text{ cm}^3$) con techos de policarbonato, provistas de una lámpara de calor de 150 W conectada a un termostato digital cuya sonda estaba posicionada al mismo nivel del animal, permitiéndonos un control individualizado de la temperatura ambiente de cada uno.

2.3. PROCEDIMIENTO

Las ratas fueron encargadas de forma sucesiva en tandas de 12 ratas de cada vez y fueron sometidas al procedimiento SIH, como se detalla en el esquema del procedimiento que se incluye en la Figura 3.

Una semana antes de comenzar el experimento, las ratas fueron operadas para la implantación de un transmisor de temperatura corporal y actividad (G2 E-Mitter; Respirationics Mini Mitter Inc.). Tras la cirugía, y para verificar el bienestar de los animales, estos fueron alojados individualmente durante siete días y se monitorizó diariamente la ingesta, el consumo de agua y el peso corporal, además de realizar una valoración de la herida y el aspecto físico del animal.

Al octavo día las ratas fueron pesadas y trasladadas a las cajas con ruedas de actividad para entrar en experimento. En una primera fase, Ad Libitum (AL), las ratas tienen acceso a la rueda y a la comida 24 horas. La temperatura ambiente se estableció en $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. El peso corporal y la ingesta de los animales se monitorizó diariamente entre las 10:30 y las 11:00 h, mientras que la actividad en la rueda y la temperatura corporal se registró minuto a minuto a través del sistema informático de adquisición de datos Vital View (Respirationics, Mini Mitter Inc.). Esta fase AL tiene una duración de 28 días tras los cuales se consigue estabilizar el patrón de actividad.

La segunda fase, de restricción de alimento (RA), comenzó cuando las ratas fueron asignadas a los grupos experimentales, con un peso y nivel de actividad similar en cada uno.

Durante esta fase los animales recibieron un 60% del alimento consumido la semana anterior. En el Día 0 se implantó las minibombas osmóticas (model 2001; Alzet Osmotic Pumps Corp), en el espacio interescapular de las ratas, que permitieron la liberación de 1.29 mg/ml^{-1} de leptina recombinada de rata (suministada por ProSpec-Tany Techno-Gene Ltd.) o un volumen similar de vehículo (solución salina tamponada con fosfato). Además, la temperatura ambiental se mantuvo a 21°C para dos de los grupos, mientras que para un tercero se aumentó a 32°C , obteniendo así los grupos experimentales que se detallan en la Figura 3.

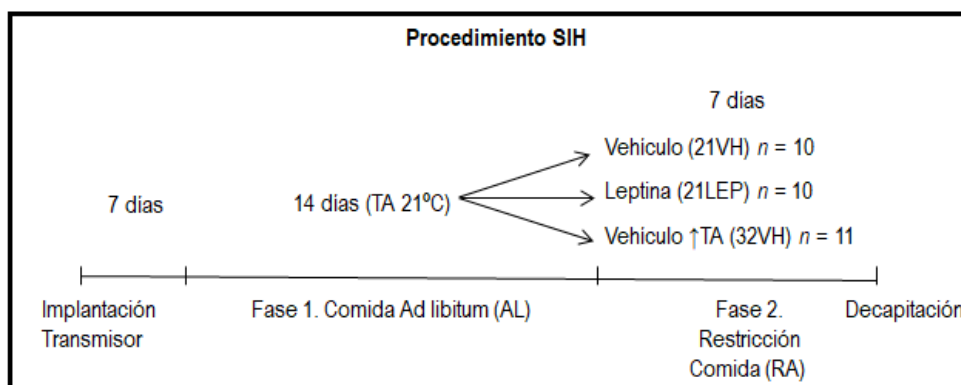


Figura 3. Detalle del procedimiento, de fases, condiciones y número de animales utilizados en el estudio de prevención de la hiperactividad en SIH.

Transcurridos siete días los animales fueron sacrificados mediante decapitación para la extracción de tejidos, que fueron congelados en hielo seco o nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta su utilización. Desafortunadamente, el malfuncionamiento de uno de los congeladores dañó las muestras de suero de este experimento.

2.4. ANÁLISIS DE ARN MENSAJERO POR PC-REAL TIME

Para determinar el efecto de la leptina y de la exposición a temperatura ambiente elevada sobre la expresión génica de diferentes neuropéptidos hipotalámicos, se utilizó PCR-Real Time.

2.5. ANÁLISIS DE PROTEÍNA POR WESTERN BLOT

Para determinar los niveles de expresión proteica de UCP1 en BAT se realizó la técnica de *western blot*.

2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se expresaron como media \pm S.E.M. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando IBM SPSS Statistics versión 21.0 (IBM Corp. Armonk, NY, EE. UU.). Para analizar las variables de peso corporal, actividad en la rueda y temperatura corporal se empleó un análisis de varianza de medidas repetidas a lo largo de los días (ANOVA) tomando como factor independiente la variable de pertenencia al grupo experimental (GRUPO). El

ANOVA de una vía fue aplicado para comparar las posibles diferencias de peso cuando entran en experimento, al inicio de la fase AL, al final de la fase AL y al principio de la fase RA. También se utilizó para analizar la ganancia de peso acumulada en cada una de las fases experimentales, los niveles de expresión génica de los neuropéptidos hipotalámicos, y los niveles proteicos de UCP1 en BAT. La prueba *t* de Student se empleó cuando se necesitó comparar una variable entre dos de los grupos y la prueba de Chi-cuadrado para la variable de porcentaje de actividad diurna. Para evitar el error tipo 1 se aplicó la corrección de Bonferroni en todas las comparaciones múltiples. Cuando la Prueba de Esfericidad de Mauchly fue significativa, se aplicó la corrección Greenhouse-Geisser. Para todos los análisis se tomó un alfa de 0.05.

3. RESULTADOS

En primer lugar, presentaremos los resultados para la fase AL en la que todos los animales están en las mismas condiciones: acceso a rueda de actividad y comida 24h y temperatura ambiente establecida en 21°C. El análisis estadístico se realizó para los últimos 14 días (representados como Día -14 a Día -1) y los datos son representados de acuerdo con la formación de los grupos en la fase RA. En segundo lugar, se presentarán los resultados relativos a la fase RA, en el que los animales son sometidos a restricción de alimento y o bien reciben un tratamiento, vehículo o leptina, o bien son expuestos a una temperatura ambiente de 32°C. Por último, se describirá el patrón circadiano de actividad en la rueda y de la temperatura corporal.

3.1. PRIMERA FASE CON COMIDA AD LIBITUM (AL)

En la Figura 4 aparece representada la actividad en la rueda (panel A), el peso corporal (panel B) y la temperatura corporal (panel C), en el que una línea punteada divide las dos fases del procedimiento SIH. Con respecto a la actividad en la rueda, el ANOVA de medidas repetidas indicó que la carrera estaba estabilizada, pues no se observaron cambios durante las dos últimas semanas de la fase AL, $F(3.9, 110.9) = 1.662$; $p = 0.164$ (Figura 4A).

Respecto al peso corporal, no se observaron diferencias en el peso corporal en el momento en que las ratas entraron en el experimento (Día -28), $F(2, 28) = 0.803$; $p = 0.458$, en el Día -14, cuando las ratas comienzan a mostrar un patrón de actividad estable, $F(2, 28) = 0.036$; $p = 0.964$, o cuando la fase AL terminó (Día -1), $F(2, 28) = 0.099$; $p = 0.906$. En la Figura 4B se muestra como el peso corporal aumentó con el paso de los días, $F(2.7, 76.5) = 511.837$; $p < 0.0001$.

Los grupos se formaron en condiciones de igualdad de actividad y peso, por lo tanto, no hubo diferencias significativas entre los grupos en ninguna de las dos variables, actividad y peso corporal, respectivamente, $F(2, 28) = 0.018$; $p = 0.983$ y $F(2, 28) = 0.312$; $p = 0.735$.

Como se muestra en la Figura 5, tampoco se observaron diferencias entre los grupos en la ganancia de peso acumulada durante los 14 últimos días con alimentación ad libitum, $F(2, 28) = 0.119$; $p = 0.889$, cuya media y SEM se presentan a continuación: 21VH, 67.70 ± 4.43 g, 21LEP, 69.90 ± 3.11 g y 32VH, 68.00 ± 2.62 g.

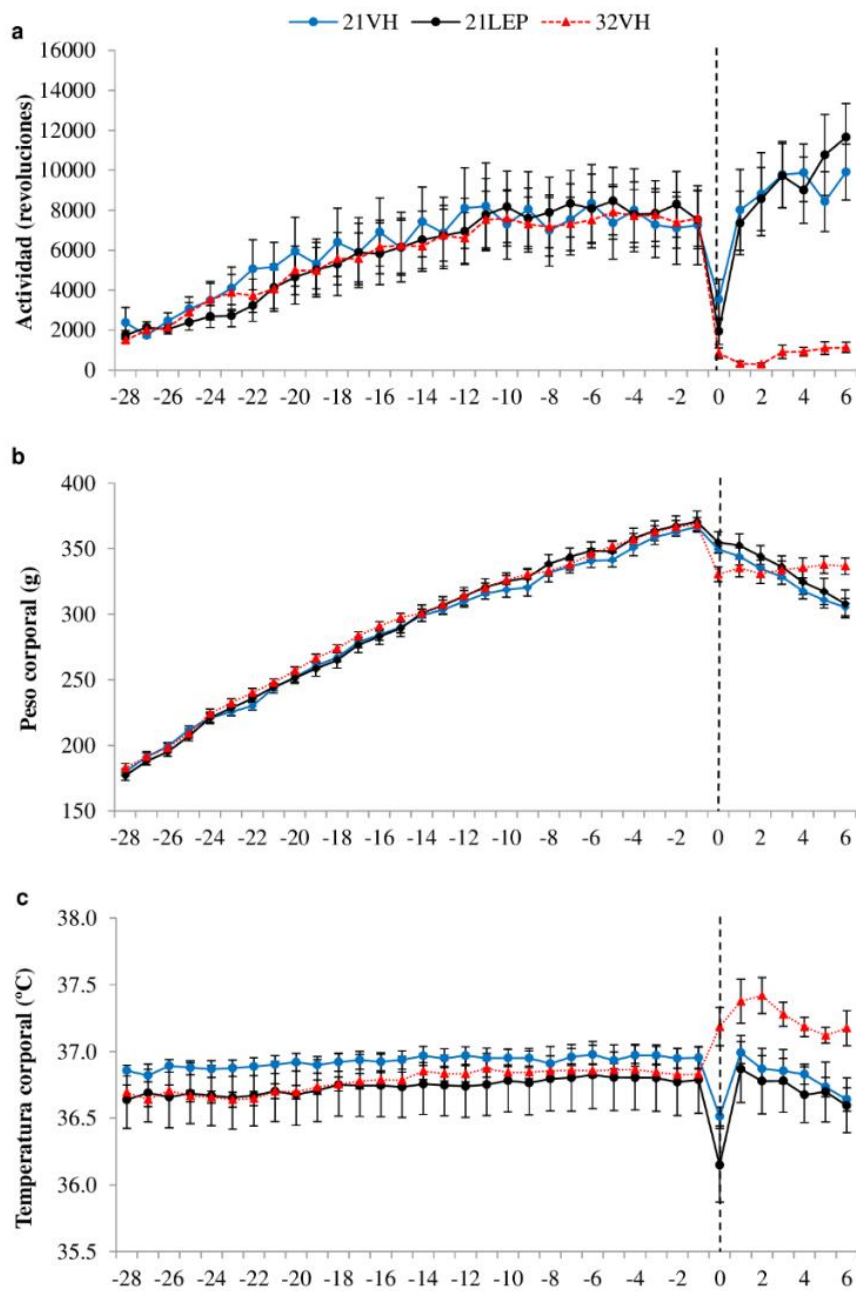


Figura 4. Actividad diaria en la rueda (A), peso corporal (B) y temperatura corporal (C) durante la fase ad libitum (Día -28 a Día -1) y durante la fase de restricción de alimento (Día 0 a Día 6). La línea vertical punteada separa las dos fases del experimento. Todos los datos se expresan como media \pm SEM.

Con respecto a la temperatura corporal (Figura 4C), esta se mantuvo estable, $F(3.4, 95.5) = 1.413$; $p = 0.241$, sin diferencias entre grupos, $F(2, 28) = 0.366$; $p = 0.697$.

Por último, la ingesta de los animales aumenta con el paso de los días, $F(6.0, 169.4) = 8.314$; $p < 0.0001$, sin diferencias entre los grupos, $F(2, 28) = 1.406$; $p = 0.262$, cuya media y SEM se presentan a continuación: 21VH, 31.39 ± 0.26 g/día; 21LEP, 32.19 ± 0.31 g/día, y 32VH, 33.44 ± 0.27 g/día.

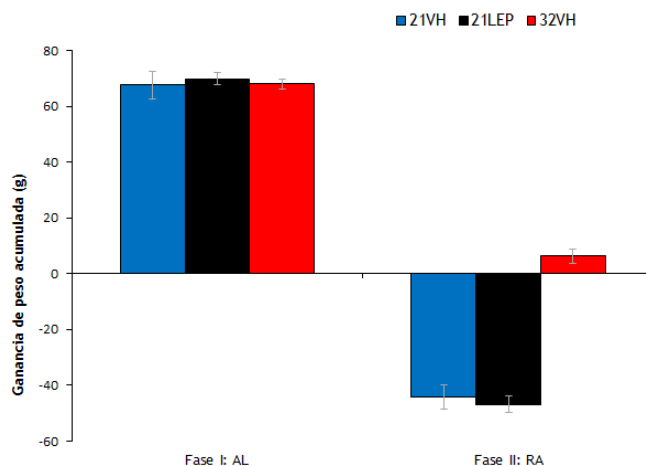


Figura 5. Ganancia de peso corporal acumulada durante la primera fase ad libitum (AL) y durante la fase de restricción de alimento (RA) para los diferentes grupos experimentales. Los datos se expresan como media \pm SEM.

3.2. SEGUNDA FASE DE RESTRICCIÓN DE ALIMENTO (RA)

Una vez transcurridos los 28 días de la Fase AL, los animales son asignados a las diferentes temperaturas ambiente (21°C vs 32°C) y sometidos a la cirugía para la implantación de las minibombas osmóticas, encargadas de administrar el tratamiento correspondiente (vehículo o leptina) en las cantidades adecuadas. Una vez que los animales son operados y devueltos a sus cajas de actividad, se retira la comida ad libitum y se administra el 60% del alimento consumido durante la semana anterior, que tendrán disponible durante 24h. La duración de esta segunda fase es de siete días, el tiempo que permiten las minibombas que se liberen los tratamientos.

Como se observa en la Figura 4A, la implantación de las minibombas produce un abrupto descenso de la actividad para los tres grupos que es recuperado al día siguiente (Día 1) a niveles basales, aunque solo para los grupos mantenidos a 21°C. La anestesia también produce un descenso de la temperatura corporal (Figura 4C) de las ratas durante las primeras horas después de la cirugía, que se recupera a niveles basales en un día, como ocurría con la actividad. Este efecto de descenso de la temperatura corporal durante las primeras horas después de la cirugía a causa de la anestesia es menos pronunciado en el grupo a 32°C, y no afectó a la media diaria. Durante la semana de restricción de alimento, las ratas mantenidas a 21°C aumentaron su actividad, mientras que las ratas calentadas a 32°C la redujeron con respecto a la fase AL. El ANOVA de medidas repetidas a lo largo de los siete días reveló un efecto principal, $F(2, 28) = 15,122$; $p < 0.0001$, que indicó que los animales a 32°C (32VH) corren menos que los animales a 21°C, independientemente de si han recibido vehículo (21VH) o leptina (21LEP), todas las $p < 0.001$. En el último día de la fase RA, los animales a 21°C corren entre ocho y diez veces más que los animales calentados a 32°C. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre los grupos a 21°C en función del tratamiento recibido, $p = 0.999$, en el Día 1 las ratas tratadas con leptina mostraron una actividad significativamente menor que las ratas tratadas con vehículo, $p = 0.025$.

La Figura 4B tras la línea vertical punteada, representa el peso corporal para los diferentes grupos en la fase de restricción de alimento. Un ANOVA de medidas repetidas mostró que el peso corporal de las ratas evoluciona de diferente manera a lo largo de los días, $F(4.4, 61.9) =$

33.148; $p < 0.0001$. Mientras que todos los animales mantenidos a 21°C pierden peso, independientemente de si han recibido vehículo o leptina, las ratas a 32°C lo mantienen estable, aunque esto no se traduce en diferencias significativas, tal y como indicó el efecto principal, $F(2, 28) = 0.274$; $p = 0.762$. Atendiendo a la ganancia de peso acumulada, representada en la Figura 5, el ANOVA de una vía nos indicó diferencias significativas entre los grupos, $F(2, 28) = 52.385$; $p < 0.0001$. Como ya habíamos observado con la media diaria de peso corporal, respecto a la ganancia de peso corporal, todos los animales a 21°C perdieron peso (sin diferencias en función del tratamiento, todas las $p > 0.05$), pero las ratas a una temperatura ambiente de 32°C no solo preservaron mejor el peso, sino que lo aumentaron, encontrando diferencias estadísticamente significativas con respecto a las ratas mantenidas a 21°C (ambas $p < 0.0001$).

Con respecto a la temperatura corporal, se observó un efecto de interacción, $F(5.2, 73.1) = 2.312$; $p = 0.05$, y un efecto principal, $F(2, 28) = 4.941$; $p = 0.015$, que fue indicativo del descenso de temperatura corporal para todos los animales mantenidos a una temperatura ambiente de 21°C (sin diferencias significativas en función del tratamiento) durante la fase de RA, mientras que la temperatura corporal de los animales a una temperatura ambiente de 32°C aumentó (Figura 4C). Los análisis post-hoc revelaron que estas diferencias en la temperatura corporal durante la segunda fase se deben a las diferencias existentes entre los grupos 32VH y 21LEP ($p = 0.009$), ya que las diferencias entre 32VH y 21VH no alcanzaron la significación ($p = 0.052$).

3.3. CICLO CIRCADIANO DE LA ACTIVIDAD Y LA TEMPERATURA CORPORAL

Para profundizar en los efectos que la leptina y el calor podrían tener sobre la actividad y la temperatura corporal de las ratas, se analizó ambas variables en función del ciclo de luz/oscuridad. Así, obtuvimos la actividad y temperatura corporal media diaria durante las 12 horas de luz (08:00 a 19:59) y las 12 horas de oscuridad (20:00 a 07:59), por separado. También se calculó la proporción de actividad durante el día, mostrada en forma de porcentaje: $\text{ratio de Luz} / (\text{Luz} + \text{Oscuridad}) \%$, que consiste en dividir la actividad media diaria durante las 12 horas de luz entre la actividad media total realizada durante las 24 horas del día. Esta forma de analizar el desempeño de un animal en una rueda de actividad es menos común y se diferencia de la actividad media diaria, en que tiene en cuenta la actividad desarrollada en cada uno de los períodos del ciclo circadiano.

Las ratas son animales nocturnos, es decir, realizan la mayoría de sus actividades durante la noche, ya sea comer, acicalarse, aparearse, etc., por lo tanto, cuando se introduce una rueda de actividad en el entorno del animal, esta será utilizada mayormente durante las horas de oscuridad. En la Figura 6 se representa la actividad y la temperatura corporal diurna y nocturna durante la fase AL, que como era de esperar, se observa una mayor actividad y en consecuencia una mayor temperatura corporal durante las horas de oscuridad.

A continuación, centrándonos en el efecto de la leptina y el aumento de la temperatura ambiente a 32°C sobre la actividad durante la fase RA, se estudiaron dos variables: la actividad media diaria realizada en cada período de luz y cada período de oscuridad y la proporción de actividad diurna con respecto a la actividad media total de cada día. La actividad media diurna y la actividad media nocturna aparecen representadas en la Figura 7, mientras que la proporción de actividad diurna aparece representada en la Tabla 12 y expresada en porcentaje.

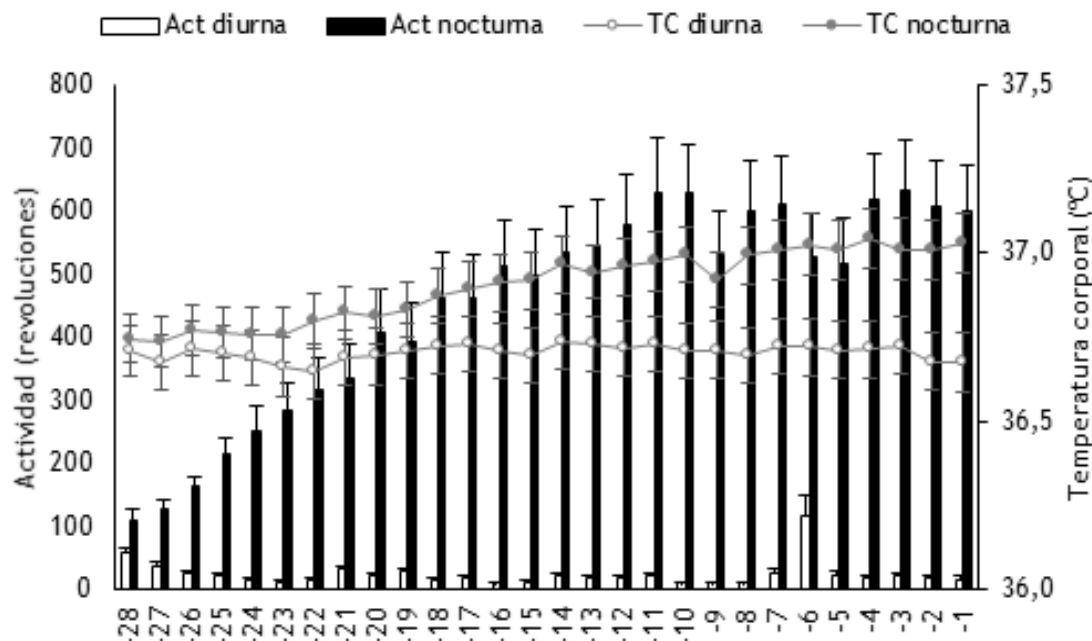


Figura 6. Actividad media diaria y temperatura corporal durante la fase de luz y durante la fase de oscuridad en la fase ad libitum (AL). Todos los datos se expresan como media \pm SEM.

Como ya hemos comentado en la introducción general de esta tesis, la exposición a la restricción de una única comida diaria produce un aumento progresivo de la actividad en la rueda primero durante el período de oscuridad y luego también durante la fase de luz. Contrariamente a lo esperado, durante la fase RA, nuevamente se observa que los animales corren más durante las horas de oscuridad, al igual que en la fase AL. Por otro lado, las ratas tratadas con leptina mostraron, durante los cuatro primeros días de restricción de alimento, una disminución en la proporción de actividad diurna comparado con las ratas tratadas con vehículo (Tabla 12). Esta proporción de actividad diurna de las ratas 21LEP aumentó en los últimos días de la fase RA, y especialmente en el último día. En el caso de las ratas mantenidas a 32°C, en los primeros dos días de restricción de alimento, presentaron una proporción de actividad diurna superior a los demás grupos que desaparece y se mantiene sin cambios hasta el final de experimento.

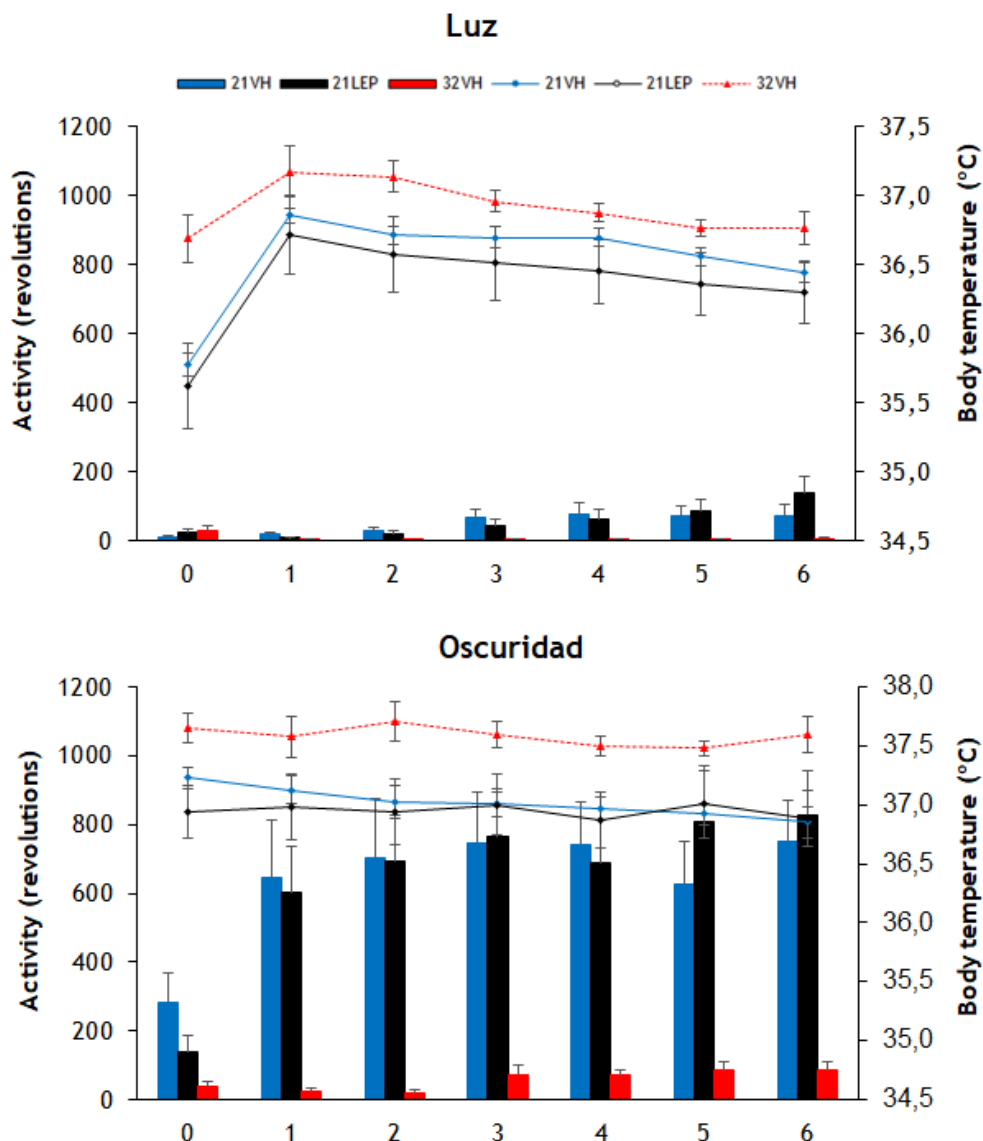


Figura 7. Actividad media diaria y temperatura corporal durante la fase de luz (panel superior) y durante la fase de oscuridad (panel inferior) en la fase de restricción de alimento (RA). Todos los datos se expresan como media \pm SEM.

Con respecto a la temperatura corporal, los animales presentaron una temperatura corporal más elevada durante la noche. Un ANOVA de medidas repetidas reveló que la temperatura corporal de los animales, durante el ciclo de luz, desciende a lo largo de los días, $F(2.1, 58.3) = 55.484$; $p < 0.0001$. Se observó una interacción $F(4.3, 58.3) = 4.700$; $p = 0.002$, y un efecto principal, $F(2, 27) = 3.598$; $p = 0.041$, significativos. Esto indicó que el descenso de la temperatura corporal durante la fase de luz (Figura 7, panel superior) es significativamente más lento y menos pronunciado para las ratas 32VH respecto a las ratas 21LEP, $p = 0.040$, pero no en comparación a las ratas 21VH. Tampoco se observaron diferencias entre los grupos mantenidos a 21°C, $p = 0.711$. Con respecto a la temperatura corporal durante el ciclo de oscuridad (Figura 7, panel inferior), el ANOVA de medidas repetidas reveló que esta se mantiene estable a lo largo de los días, $F(3.4, 92.7) = 1.985$; $p = 0.113$, con diferencias entre los grupos, $F(2, 27) = 5.362$; $p = 0.011$. Así, mientras que las ratas calentadas a 32°C mantienen

una temperatura corporal significativamente más elevada que las ratas 21VH, $p = 0.001$, y casi alcanza la significación con respecto a las ratas 21LEP, $p = 0.09$, no se observaron diferencias entre las ratas mantenidas a 21°C , $p = 0.960$. Por lo tanto, la disminución en la temperatura media diaria que sufren los animales mantenidos a 21°C está relacionada con una disminución de la temperatura durante las horas de luz y no durante la noche.

	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
21VH	---	3.2% ^c	4.2% ^c	8.2% ^c	9.8% ^c	10.6% ^a	9.2%
21LEP	---	1.8%	3.2%	3.6%	5.6%	9.8% ^b	14.6% ^{b,c}
32VH	---	14.0% ^{a,b}	14.3% ^{a,b}	6.0%	9.0%	6.3%	8.5%

Tabla 14. Porcentaje de la ratio de actividad diaria durante la fase de luz/actividad diaria total - L/(L+O)- durante la fase de restricción (RA). Los datos de actividad para el Día 0 fueron excluidos del análisis debido a la atenuación de la actividad por la implantación de la minibombas osmóticas. Abreviaturas: ^a. Diferencias significativas entre 21VH and 32VH. ^b. Diferencias significativas entre 21LEP and 32VH. ^c. Diferencias significativas entre 21VH and 21LEP. Test de Chi cuadrado, todas las significaciones $p < 0.001$.

3.4. NIVELES DE RNA MENSAJERO EN EL ARCUATO

El núcleo arcuato (ARC) está considerado como uno de los núcleos más importantes implicados en el control y regulación de la ingesta y está compuesto por dos poblaciones neuronales bien diferenciadas que integran las señales del balance energético y ejercen efectos opuestos. Por un lado, las neuronas anorexigénicas POMC/CART y por otro las neuronas orexigénicas AgRP/NPY, constituyen el sistema de melanocortinas, responsable de regular el apetito y el balance energético (Barsh & Schwartz, 2002; Wen, Wang, Gong, & Zhou, 2018). El estudio de estos neuropéptidos hipotalámicos en el modelo animal ABA demostró que, en respuesta al balance energético negativo, la expresión de AgRP se activó mientras que se inhibió la de POMC (Adan et al., 2003; Kas et al., 2003; Rijke et al., 2005). Además, en este mismo modelo animal, la sobreexpresión del receptor MC4 del sistema de melanocortinas, se redujo con la aplicación de calor (Gutiérrez et al., 2009). Por otro lado, la leptina es una señal anorexigénica y actúa a través de la activación de las neuronas POMC y la inhibición de las neuronas AgRP, reduciendo la ingesta (Villanueva & Myers, 2009). Por lo tanto, se decidió analizar los diferentes neuropéptidos hipotalámicos para evaluar el efecto que tiene la aplicación de calor en ratas sometidas al procedimiento SIH.

En la Figura 8 se muestran los niveles de RNA mensajero de los neuropéptidos en el núcleo arcuato del hipotálamo en los diferentes grupos. El ANOVA de una vía reveló diferencias significativas entre los grupos en los niveles génicos de POMC, CART, NPY y MC4R (todas las $p < 0.01$), pero no para AgRP ($p = 0.117$). Los niveles de NPY y MC4R están reducidos en las ratas 21LEP y 32VH, aunque este efecto solo alcanzó la significación en las ratas calentadas (ambas $p < 0.01$). Los niveles de mRNA de AgRP parecen regulados al alza en las ratas tratadas con leptina, aunque las diferencias con respecto a las ratas vehículo y las ratas a 32°C no son significativas. Por otro lado, los niveles de mRNA de POMC se mostraron significativamente elevados, tanto en el grupo 21LEP ($p = 0.03$) como el grupo 32VH ($p = 0.003$). Este efecto es más fuerte en las ratas 32VH, en las cuales el aumento es del 71% respecto a las ratas 21VH, mientras que el de las ratas 21LEP es de un 34%. Por último, los niveles de expresión de mRNA de CART sólo mostró un aumento en las ratas 32VH ($p = 0.044$).

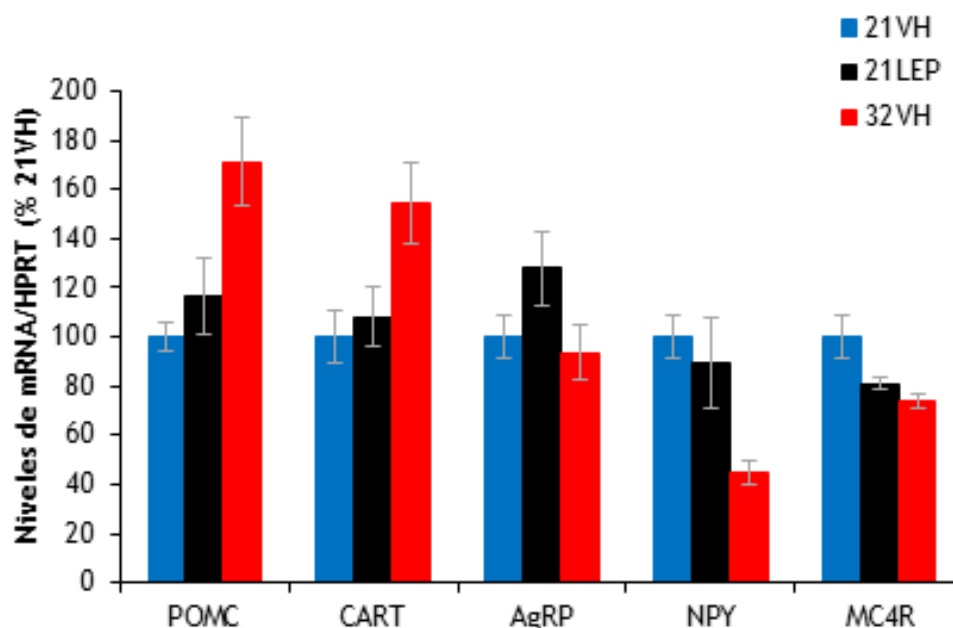


Figura 8. Niveles de mRNA de POMC, CART, AgRP, NPY y MC4R en el núcleo arcuato del hipotálamo. Todos los datos se expresan como media \pm SEM.

3.5. NIVELES PROTEICOS DE UCP1 EN BAT

La leptina además de regular el balance energético a través de la ingesta también está implicada en el gasto energético. A través de la estimulación de la actividad del sistema nervioso simpático (SNS), incrementa la termogénesis, y, por ende, la expresión de UCP1 en el BAT (Commins, Watson, Levin, Beiler, & Gettys, 2000; Dodd et al., 2015; Morrison, Madden, & Tupone, 2014; Pandit et al., 2017). Por lo tanto, con el objetivo de conocer cómo afecta el aumento de la temperatura ambiente se analizaron los niveles de UCP1 en el tejido adiposo pardo (BAT de las siglas en inglés, *brown adipose tissue*) de los animales sometidos al procedimiento SIH.

Como se observa en la Figura 9, los niveles de proteína de UCP1 en BAT de las ratas 32VH están significativamente reducidos en comparación con los animales mantenidos a 21°C, independientemente de si han recibido vehículo ($p = 0.001$) o leptina ($p < 0.0001$). Por otro lado, los niveles de UCP1 de las ratas 21LEP están elevados con respecto a las ratas 21VH, $p = 0.045$.

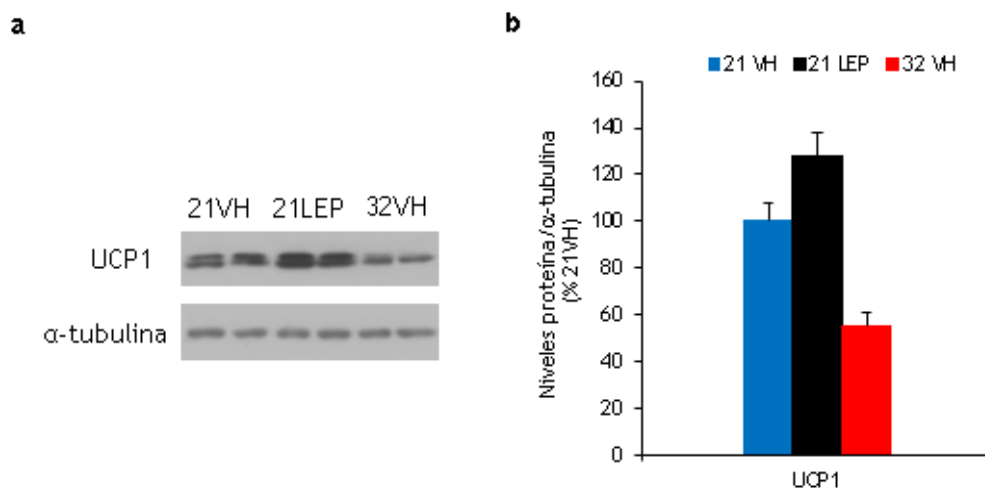


Figura 9. Imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (A) y niveles de UCP1 en el BAT (B). Los datos se expresan como media \pm SEM.

4. DISCUSIÓN

La hiperactividad ha sido descrita en la anorexia nerviosa por clínicos e investigadores desde las primeras descripciones modernas de la enfermedad (Casper, 1998, 2006), la cual parece estar presente hasta en un 80% de las pacientes con anorexia nerviosa (Davis, 1997). Históricamente, la hiperactividad no ha sido considerada una característica relevante en el trastorno (Gutiérrez et al, 2002) hasta la publicación de Kron et al. (1978), y en consecuencia se le ha dado un papel secundario en las diferentes versiones aparecidas de la serie DSM, concibiendo esta característica como una mera estrategia voluntaria para quemar calorías (Meyer, Taranis, & Touyz, 2008). Sin embargo, esta conceptualización contradice la investigación de Davis et al (2005), la cual mostró que la actividad excesiva a menudo precede el inicio del trastorno. Además, otros autores señalaron la relevancia de la hiperactividad, como Janet que ya en 1903 afirmaba que: “*la exageración del movimiento es a veces anterior a la negativa de alimentos y por lo tanto precede a todos estos razonamientos*” (p.501). También Charles Lasègue (1873) el autor que presentó el primer caso de anorexia nerviosa descrito con detalle en la literatura indicaba que en la anorexia nerviosa la abstinencia de los alimentos “*tiende a aumentar la aptitud para el movimiento*” (p.266). De igual manera, en esta misma línea Janet reconocía el impacto negativo de la actividad excesiva sobre la comida cuando afirmaba que “*la exaltación de la fuerza, el sentimiento de euforia, como se conoce en los santos extáticos, por ejemplo, elimina la necesidad de comer*” (1907, pág. 242). Igualmente, William Gull (1874), al que se debe la acuñación misma del término actual de anorexia nerviosa reconocía, por primera vez en la literatura ya en el siglo XIX, que este perfil hiperactivo debería “*controlarse, pero esto a menudo es difícil*” (pág. 25), lo que sigue siendo uno de los mayores problemas a la hora de tratar la anorexia nerviosa tanto en el tratamiento ambulatorio como en los internamientos en las unidades especializadas. En el momento de redactar esta tesis doctoral aún está activa la petición de colaboraciones del Journal of Eating Disorders, para confeccionar un número temático especial (Raising the bar in the treatment of over-exercise in people with

AN) basado en la afirmación de sus editores (Meyer, Touyz & Hay, 2019; <https://jeatdisord.biomedcentral.com/>) que *“El ejercicio es la “Cenicienta” descuidada de la fenomenología de los trastornos de la alimentación, pero es un determinante importante de los resultados y su restricción en los tratamientos a menudo es muy resistente y poco conocida”*.

Como ya hemos explicado en la introducción teórica, los modelos animales no pueden reproducir los procesos mentales que caracterizan a la anorexia nerviosa. Sin embargo, su analogía se basa en los paralelismos de los signos del trastorno en humanos y las características de los animales sometidos a libre acceso a rueda de actividad y restricción de alimento. Estos modelos han contribuido al progreso en la comprensión de lo que supone la interacción de estas dos condiciones y con un propósito traslacional ha generado nuevos tratamientos de los que podrían beneficiarse las pacientes con anorexia nerviosa.

Así, los resultados obtenidos en este estudio proporcionan una evidencia más de que el aumento de la temperatura ambiente es una estrategia extremadamente efectiva para prevenir la actividad excesiva y la pérdida de peso cuando las ratas cambian de una alimentación ad libitum a restricción de alimento, tal y como ocurre con las ratas tratadas con vehículo. Contrariamente a lo descrito por Exner et al. (2000), en nuestro estudio la leptina no ayudó a las ratas a disminuir el aumento de actividad en la rueda durante la fase de alimentación restringida. La actividad mostrada por las ratas alojadas a 32°C fue diez veces menor que la actividad mostrada por las ratas mantenidas a 21°C, independientemente de si fueron tratadas con leptina o con vehículo. Si bien la combinación de restricción de alimento y rueda de actividad produce la desregulación del ritmo circadiano de la actividad (Hara, Ogawa, & Imada, 1981; Watanabe et al., 1990), sólo entre un 4% y un 5% de la actividad nocturna en la fase ad libitum pasó a ocupar las horas de luz, en las ratas con una temperatura ambiente de 21°C, porque en las ratas calentadas a 32°C, este porcentaje asciende hasta un 11%. Aun así, todas las ratas continúan corriendo más durante las horas de noche a pesar de la restricción alimentaria, manteniendo inalterado el patrón circadiano de la actividad. A pesar de no encontrar un efecto significativo de la leptina sobre la actividad media diaria, sí se detectó que la infusión con leptina produjo un efecto reductor transitorio de la proporción de actividad durante las horas de luz con respecto a la actividad total diaria en los cuatro primeros días de la fase RA, para posteriormente aumentar su actividad, sobrepasando la desarrollada por las ratas tratadas con vehículo.

Con respecto al peso corporal, el aumento de la temperatura ambiente permitió que estas ratas ganaran peso a pesar de la restricción de alimento, mientras que las ratas mantenidas a 21°C perdieron peso, de nuevo sin diferencias entre las ratas tratadas con vehículo o leptina.

Con respecto a la temperatura corporal, el aumento de la temperatura ambiente volvió a presentarse como un factor determinante durante la fase RA. Así, mientras las ratas mantenidas a 21°C sufren una disminución significativa de la temperatura corporal, las ratas alojadas a 32°C logran conservarla, llegando incluso a superar en dos a tres décimas de grado la temperatura corporal de la fase AL. Además, estos resultados suponen la demostración, por primera vez en la literatura, de que el aumento de la temperatura ambiente previene la hipotermia en ratas sometidas a restricción de alimento, reforzando así la evidencia de la teoría termorreguladora de la hiperactividad (Gutiérrez, 2002).

Otro punto interesante son las marcadas diferencias en la actividad mostrada por las ratas entre el estudio de Exner et al. (2000) y nuestro estudio. A pesar del uso de ratas de la misma

edad, los autores del estudio original informaron de una actividad máxima media de 4800 revoluciones el último día de la fase RA (Día 6), mientras que en este estudio las ratas mostraron más del doble de actividad, rondando las 11.000 revoluciones. Además, informan de un aumento de actividad, en la fase RA, tres veces mayor que la actividad desarrollada durante la fase AL, mientras que en nuestro estudio esta relación es mucho más baja, siendo solo 1,4 veces superior. En un primer momento podría parecer que la utilización de diferentes cepas de rata, Wistar en el estudio de Exner et al. (2000), y Sprague-Dawley en nuestro caso, fuera la causa de estas diferencias. Actualmente, no existen estudios que evalúen las posibles diferencias en el desempeño en una rueda de actividad entre las cepas Wistar y Sprague-Dawley a excepción de uno: Bauer (1990) exploró los patrones circadianos de actividad sin encontrar diferencias significativas, ni tampoco en los niveles de actividad durante 24 horas, entre estas dos cepas de rata. De hecho, en las investigaciones que requieren del uso de una rueda de actividad, se emplea una u otra cepa indistintamente.

Con respecto a los niveles de ARNm en el núcleo arcuato del hipotálamo, los resultados están en línea con los datos reportados por (Hillebrand et al., 2005b), la leptina aumentó POMC con respecto a las ratas vehículo, pero no hubo diferencias en la expresión del ARNm de AgRP y NPY en el núcleo arcuato. El aumento de temperatura ambiente también tuvo un impacto significativo en la expresión de CART, lo cual es coherente con el aumento significativo en la expresión de ARNm de CART en el arcuato de animales alojados a 30°C en comparación con una temperatura ambiente de 22°C (Lau, Shi, & Herzog, 2016). La sobreexpresión del receptor MC4 de las ratas mantenidas a 21°C fue reducido por el calor, tal y como hemos descrito anteriormente (Gutiérrez et al., 2009). Por otro lado, fue inesperado el aumento de la expresión de POMC en ratas a 32°C, que difiere del mismo estudio en el que se mostró disminución de POMC en ratas calentadas, aunque este informe se realizó en ratas ABA que alcanzaron un peso corporal significativamente menor (Gutiérrez et al, 2009).

También, el aumento de la temperatura ambiente redujo significativamente la expresión de UCP1 en el BAT, mientras que la leptina la incrementó. Esta disminución en el gasto de energía de los animales a 32°C, probablemente explica una mejor preservación del peso corporal. Como ya hemos descrito en un estudio anterior con un grupo de ratas pairfed, ante la restricción de alimento, un ambiente cálido influyó más sobre el mantenimiento del peso corporal que la disponibilidad de alimento (Cerrato et al, 2012). Por otro lado, el aumento de la termogénesis en las ratas tratadas con leptina no se asoció con un aumento de la temperatura corporal (diaria, en la fase de luz o en la fase de oscuridad) ni con una mayor pérdida de peso. Teniendo en cuenta que 21°C supone un leve estrés por frío, incluso para los animales alimentados ad libitum (Gordon, Lee, Chen, Killough, & Ali, 1991), la defensa de la temperatura corporal exige un gasto de energía adicional para los animales mantenidos a 21°C (Speakman & Keijer, 2013). Además, debido a la condición de alimentación restringida, este gasto extra de energía conduce a la pérdida de peso corporal y al colapso de la temperatura corporal en los últimos días de la fase RA. En consecuencia, la ingesta de alimento durante la fase RA es claramente insuficiente para compensar el coste energético asociado con la defensa de la temperatura corporal sumada al coste de la actividad en la rueda.

Este estudio presenta algunas ventajas con respecto al realizado por Exner et al. (2000) que deben tenerse en cuenta. La primera es la utilización de transmisores subcutáneos para la monitorización de la temperatura corporal. La segunda es el análisis de los diferentes neuropéptidos hipotalámicos, y, por último, el análisis de UCP1 en BAT. Estas tres medidas

adicionales ayudan a tener una visión más amplia, tanto del efecto de la elevación de la temperatura ambiente como de la leptina, en el modelo SIH.

En contraposición, la mayor limitación de este estudio fue la ausencia de las medidas de los niveles séricos de leptina para comprobar su correcta liberación por parte de las minibombas osmóticas y su funcionamiento. Además, este estudio presenta diferencias en otros aspectos metodológicos con respecto al estudio de Exner et al. (2000) que podrían responder a la disparidad de los resultados. En primer lugar, y aunque ya ha sido descartado, el uso de la cepa Sprague-Dawley en lugar de Wistar. En segundo lugar, la temperatura ambiente del laboratorio establecida en 21°C mientras que en el estudio de Exner et al. (2000) fue de 23°C. Y, por último, el empleo de leptina recombinada de rata en lugar de ratón.

Teniendo en cuenta las diferencias existentes en la actividad de los animales de este estudio con respecto a los animales del estudio original, se propuso realizar una serie de estudios con el procedimiento SIH, pero en el que la primera fase AL se redujese a una duración de dos semanas para así igualar el nivel de actividad a las ratas de Exner y poner a prueba las diferencias metodológicas anteriormente citadas.





CAPÍTULO CUARTO
Efectos de la actividad basal,
la temperatura ambiental, la
dosis y tipo de leptina en el
procedimiento SIH





1. INTRODUCCIÓN

En el anterior capítulo se intentó replicar el estudio de Exner et al. (2000) sobre la prevención de la hiperactividad con la administración periférica de leptina mediante una minibomba en animales sometidos a restricción de comida de acuerdo con el procedimiento SIH. También se puso a prueba la eficacia comparativa del aumento de la temperatura ambiente. Sin embargo, a diferencia de los resultados obtenidos por Exner et al. (2000) los animales tratados con leptina aumentaron la actividad en la rueda al mismo nivel que las ratas tratadas con vehículo, mientras que los animales alojados en cajas incubadoras a 32°C disminuyeron su actividad con respecto a la exhibida durante la fase ad libitum (AL). Además de la ausencia de efecto de la leptina, otra discrepancia con el estudio original reside en las diferencias de actividad de los animales durante la fase AL. Así, en el capítulo anterior la actividad rondaba en torno a las 8.000 revoluciones durante la última semana de la fase AL, mientras que Exner et al. (2000) informan en su estudio de una actividad cuatro veces inferior (en torno a las 2.000 revoluciones) en los animales durante el mismo período, es decir en la última semana de la fase AL. Como ya señalábamos en el apartado de discusión en el capítulo anterior, estas diferencias en los niveles de actividad son difíciles de atribuir a las diferentes cepas de ratas empleadas, Sprague-Dawley en nuestro caso y Wistar en el estudio original, ya que no parecen existir diferencias en la actividad circadiana entre estas dos cepas de ratas albinas (Bauer, 1990).

Esta disparidad con respecto a los datos presentados por Exner y la desafortunada pérdida de la sangre de estos animales que no permitió el análisis de los niveles circulantes de leptina, podría indicar que la leptina no estaba funcionando, por lo que se hace necesario comprobar este hecho. También, a la luz de las diferencias en la actividad basal entre ambos estudios, es necesario descartar la posibilidad de que la ausencia de eficacia de la leptina en nuestro caso resida en las diferencias en la actividad basal. La posibilidad de que la minibomba no haya funcionado correctamente, o incluso que los animales hubiesen desarrollado una resistencia al efecto inhibitorio de la leptina administrada periféricamente en la actividad también son posibles explicaciones. La pérdida de las muestras de sangre en el primer caso, y la imposibilidad de detectar el efecto inhibitorio de la leptina sobre la ingesta en el modelo SIH por las peculiaridades de la administración del alimento nos impiden descartar estas dos últimas posibilidades. Por otra parte, las diferencias obtenidas, aunque discretas, en los diferentes neuropéptidos hipotalámicos y al aumento de la expresión proteica de UCP1 en el BAT en los animales tratados con leptina comparados con los animales tratados con vehículo parecen poder descartar bien el defecto en las minibombas, o el desarrollo de una resistencia a la leptina.

Así pues, con el objeto de descartar las posibilidades señaladas, además de otras circunstancias que pasamos a enumerar a continuación, se diseñaron cuatro estudios que incluían grupos experimentales específicos para descartar las interrogantes surgidas a tenor de las diferencias entre el estudio realizado por Exner et al. (2000) y nuestro intento de replicación descrito en el capítulo anterior.

En primer lugar, para descartar que la ausencia del efecto de la leptina se deba a las diferencias en la actividad basal, se tomó la decisión de reducir la duración de la fase ad libitum a 14 días ya que la actividad de los animales en los primeros 14 días de la fase ad libitum en nuestro primer estudio era similar al mostrado por los animales del estudio de Exner et al. (2000) al final de los 28 días de línea de base. Relacionado también con las diferencias comentadas en cuanto a la actividad durante la fase AL, una posibilidad adicional puede consistir en la

influencia de la temperatura ambiente empleada en el estudio original como responsable de los bajos niveles de actividad de estos animales, pues se trata de una variable relevante a la hora de modular la actividad (Gutiérrez, 2002). De hecho, la temperatura en el laboratorio de Exner fue de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, mientras que en el estudio realizado en el capítulo anterior la temperatura se estableció en $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, suficiente para dar lugar a diferencias en el desempeño de una rata ante una rueda de actividad. En consecuencia, se propuso un estudio en el que la temperatura ambiente desde la fase ad libitum se estableciese en 25°C , una temperatura suficiente como para mostrar una interacción con el efecto de la leptina.

Numerosos estudios han demostrado como la administración de leptina reduce la ingesta, y si el tiempo de administración lo permitía, también el peso corporal en ratas o ratones alimentados ad libitum o bajo restricción de alimento (Ahima et al., 1996; Barazzoni et al., 2003; Barzilai et al., 1997; Campfield, Smith, Guisez, Devos & Burn, 1995; Chen & Heiman, 2000; Choi et al., 2008; Döring, Schwarzer, Nuesslein-Hildesheim & Schmidt 1998; Fernández-Galaz et al., 2002; Halaas et al., 1997; Harris et al., 1998; Hulsey, Lu, Wang, Martin & Baile, 1998; Patel & Ebenezer, 2007; Richy, Burlet, Max, Burlet & Beck, 2000; Ruffin & Nicolaidis, 1996; Sarmiento et al., 1997; Scarpance, Matheny, Pollock & Turner, 1997; Satoh et al., 1997; Seeley et al., 1996; Wang et al., 1998). A pesar de que en el estudio que se realizó en el anterior capítulo sobre los efectos de la leptina en la reversión de la hiperactividad en el modelo SIH, la leptina está ejerciendo diferentes efectos, no es posible detectar diferencias en el consumo de alimento, ya que normalmente los animales ingieren el total de la ración de comida en las 24 horas disponibles. En este capítulo se replicó de nuevo el estudio, pero introduciendo la novedad de un control de la ingesta durante los primeros noventa minutos después de cada administración diaria de las raciones. Esta estrategia nos permite además comparar la ingesta en SIH en condiciones similares a las que se encuentran expuestos los animales en el entorno experimental ABA que, como hemos descrito en el capítulo anterior, solo tienen acceso a la comida durante noventa minutos. Esto también nos permitirá comparar los datos con los reportados por Hillebrand et al. (2005b) referidos a la ingesta reducida de animales expuestos a ABA tratados con leptina (aunque en este caso la infusión de leptina se administró ICV). Además de medir la ingesta durante los primeros 90 minutos tras la recepción de la comida, se decidió realizar otro estudio paralelo en el que las ratas fueron alimentadas ad libitum y que, además, también fue realizado por el grupo de Exner et al. (2000).

Otra diferencia de nuestro estudio con respecto al original, que ya hemos comentado en la discusión del anterior capítulo, es el origen de la leptina utilizada. Mientras el grupo de Alemania utiliza leptina procedente del ratón, nosotros empleamos leptina procedente de rata. En el estudio del efecto de la leptina, sobre todo en los primeros años, era común administrar leptina de una especie diferente de la especie que lo recibía. Así, se administraba leptina de ratón a ratas (Barzilai et al., 1997; Haynes, 1997; Hulsey et al., 1998; Richy et al., 2000; Ruffin & Nicolaidis, 1996; Scarpance et al., 1997; Scarpance, Nicolson & Matheny, 1998; Scarpance & Matheny, 1999; Seeley et al., 1996; Sivitz, Walsh, Morgan, Thomas & Haynes, 1997) e incluso leptina de humano tanto a ratas como a ratones (Chen & Heiman, 2000; Halaas et al., 1997; Harris et al., 1998; Pelleymonter et al., 1995; Sarmiento et al., 1997), obteniendo buenos resultados. Si bien, las moléculas de leptina de rata y de ratón son similares en un 95.9% (Choi, Li, Hartzell, Della-Fera & Baile, 2003), esta reducida inexactitud quizás podría ser suficiente para provocar diferencias en la eficacia de uno u otro tipo de leptina sobre la especie de rata. El único estudio que abarca esta cuestión es el estudio realizado por Choi et al., (2003). En él compararon el efecto de la leptina de rata y ratón, administrada ICV, sobre la ingesta, el peso corporal, la temperatura corporal y la apoptosis de diferentes depósitos de grasa (inguinal y

retroperineal) en ratas Sprague-Dawley. Los resultados parecen indicar una mayor efectividad de la leptina de rata, pero únicamente en la disminución de los depósitos de grasa, pues no se encontraron diferencias significativas con respecto a la ingesta, el peso o la temperatura corporal. Un aspecto para tener en cuenta es que todos estos estudios se realizaron fuera de un contexto de acceso a rueda de actividad, por lo que decidimos realizar otro estudio en el que un grupo de ratas que fue sometido al modelo SIH, en lugar de administrar leptina de rata se le administró leptina de ratón, y así descartar que nuestras diferencias con el grupo de Exner no se deben a esta cuestión.

Por otro lado, estudios de dosis realizados (Döring et al., 1997; Fernández-Galaz et al., 2002; Grill, 2002; Haalas et al., 1997; Harris et al., 1998; Hulsey et al., 1998; Luheshi, Gardner, Rushforth, Loudon & Rothwell, 1999; Satoh et al., 1997; Wang et al., 1998) generalmente parecen indicar que una mayor dosis de leptina, o bien es la que produce cambios significativos, o bien genera una mayor reducción de la ingesta, un mayor aumento del gasto energético y en consecuencia una mayor pérdida de peso. Por ello se decidió evaluar el efecto de una dosis de leptina más elevada, concretamente de 2 mg/ml^{-1} , en ratas con restricción de alimento y en ratas con alimentación ad libitum, con el objetivo de averiguar si una mayor dosis nos permitiría observar diferencias en la actividad.

En conclusión, en este capítulo se van a realizar un total de cuatro estudios con grupos experimentales específicos para intentar descartar todas las dudas generadas en los resultados obtenidos en la replicación del estudio del efecto de la leptina sobre la prevención de la hiperactividad en el modelo SIH. En primer lugar, se realizará un estudio en el que la línea de base se redujo a un total de 14 días y con los tres grupos originales del estudio de reversión de la hiperactividad del anterior capítulo, es decir, un grupo tratado con leptina a 21°C , otro grupo tratado con vehículo también a 21°C y un último grupo tratado con vehículo, pero expuesto a 32°C . Esto nos permitirá dilucidar si las diferencias en la actividad basal influyen el efecto de la leptina sobre la hiperactividad. Siguiendo esta línea y teniendo en cuenta el efecto de la temperatura ambiente sobre el desempeño en una rueda de actividad (Gutiérrez, 2002), se realizó un segundo estudio con dos grupos experimentales, uno que recibe vehículo y otro que recibe leptina, en el que la temperatura ambiente del laboratorio se estableció en 25°C durante ambas fases del experimento. En segundo lugar, se evaluó el efecto inhibitorio sobre la ingesta a través de la monitorización de esta en los 90 primeros minutos tras recibir la comida en los animales sometidos a restricción de comida y también se realizó un estudio con animales ad libitum tratados con vehículo y leptina. En tercer lugar, se puso a prueba la posibilidad de que la dosis fuese pequeña para producir cambios con la evaluación de una dosis más alta de leptina, 2 mg/ml^{-1} , tanto en ratas a restricción de alimento como ad libitum. Por último, se diseñó un estudio adicional para comprobar el efecto de la leptina de ratón en animales sometidos al procedimiento SIH a los que se administró, como se detalló en el capítulo anterior, un 60% de la comida ingerida durante la segunda semana de la condición AL. Por las razones apuntadas más atrás sobre la tasa de actividad basal, en todos los estudios en los que se empleó el procedimiento SIH, la fase AL sólo se mantuvo activa durante dos semanas.

2. MÉTODO

2.1. SUJETOS

Para la realización de todos los estudios se emplearon un total de ochenta y siete ratas macho Sprague-Dawley de unas 6-7 semanas de edad y con un rango de peso de 170-190 g que fueron adquiridas en el Animalario Central de la Universidad de Santiago de Compostela (USC). Las ratas fueron alojadas comunalmente a su llegada al estabulario con comida y agua ad libitum, siendo el ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, de 8:00 a 20:00 h. La temperatura ambiente se estableció en $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

2.2. APARATOS

Para la realización de todos los estudios se utilizaron los mismos aparatos que los empleados en el primer capítulo, en el que se presentan los resultados referidos a la prevención de la hiperactividad en el modelo SIH completo, con el total de 28 días.

2.3. PROCEDIMIENTO

Las ratas fueron encargadas de forma sucesiva en tandas de 12 ratas de cada vez y se realizaron dos procedimientos diferentes, con dos fases cada uno, y que se especificarán en función del tipo de alimentación que recibieron, restricción o ad libitum, en la segunda fase.

Antes de comenzar el experimento, todas las ratas fueron operadas para la implantación de un transmisor de temperatura corporal y actividad (G2 E-Mitter; Respironics Mini Mitter Inc.). Tras la cirugía, y para verificar el bienestar de los animales, estos fueron alojados individualmente durante siete días y se monitorizó diariamente la ingesta, el consumo de agua y el peso corporal, además de realizar una valoración de la herida y el aspecto físico del animal.

2.3.1. Procedimiento SIH con fase AL de dos semanas de duración

Como se detalla en el esquema del procedimiento de la Figura 10, al octavo día las ratas fueron pesadas y trasladadas a las cajas con ruedas de actividad para entrar en experimento. En una primera fase, Ad Libitum (AL), las ratas tienen acceso a la rueda y a la comida 24 horas. Durante esta fase AL el peso corporal y la ingesta de los animales se monitorizó diariamente entre las 10:30 y las 11:00 h. Por su parte, la actividad en la rueda y la temperatura corporal se registró minuto a minuto a través del sistema informático de adquisición de datos Vital View (Respironics, Mini Mitter Inc.). A diferencia del estudio realizado en el anterior capítulo, la fase AL tiene sólo una duración de dos semanas.

La segunda fase, de restricción de alimento (RA), comenzó cuando las ratas fueron asignadas a uno de los diferentes grupos experimentales, con un peso y nivel de actividad similar en cada uno. Durante esta fase los animales recibieron un 60% del alimento consumido la semana anterior. En el Día 0, se implantó las minibombas osmóticas (model 2001; Alzet Osmotic Pumps Corp), en el espacio interescapular de las ratas, que permitieron la liberación de leptina (suministrada por ProSpec-Tany Techno-Gene Ltd.) o un volumen similar de vehículo (solución salina tamponada con fosfato).

Este procedimiento fue el empleado en tres de los cuatro estudios que se llevaron a cabo para dar respuesta a los interrogantes planteados anteriormente en la introducción de este capítulo. Además, la temperatura ambiental se manipuló en cada una de las fases en función de las necesidades experimentales como se describe a continuación y que aparece reflejado en la Figura 10. El número que identifica cada estudio hace referencia al orden temporal en que fueron realizados, siendo el Estudio 1 el primero y el Estudio 4 el último.

En un primer estudio se replicó los tres grupos experimentales de reversión de la hiperactividad del anterior capítulo para conocer si la actividad basal influencia el efecto de la leptina sobre la hiperactividad. Por lo tanto, durante la fase RA, un grupo de animales fue tratado con vehículo, otro con leptina a una dosis de 1.29 mg/ml^{-1} (dosis estándar) y otro también fue tratado con vehículo, pero se le aumentó la temperatura ambiente a 32°C . Además, también en este mismo estudio, se generó un cuarto grupo experimental que recibió una dosis de leptina más elevada de 2 mg/ml^{-1} . Así, la temperatura ambiente para estos cuatro grupos durante la fase AL y la fase RA se estableció en $21^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, excepto para el grupo tratado con calor, al que se le aumentó la temperatura ambiental a 32°C durante la fase RA.

El segundo estudio se realizó para conocer el efecto de la temperatura ambiente en la actividad basal y observar cómo esta podría influir en el efecto de la leptina sobre la hiperactividad. Para ello se llevaron a cabo dos grupos experimentales, uno tratado con vehículo y otro tratado con leptina en la dosis estándar, en el que la temperatura ambiente a lo largo de todo el procedimiento se estableció en $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

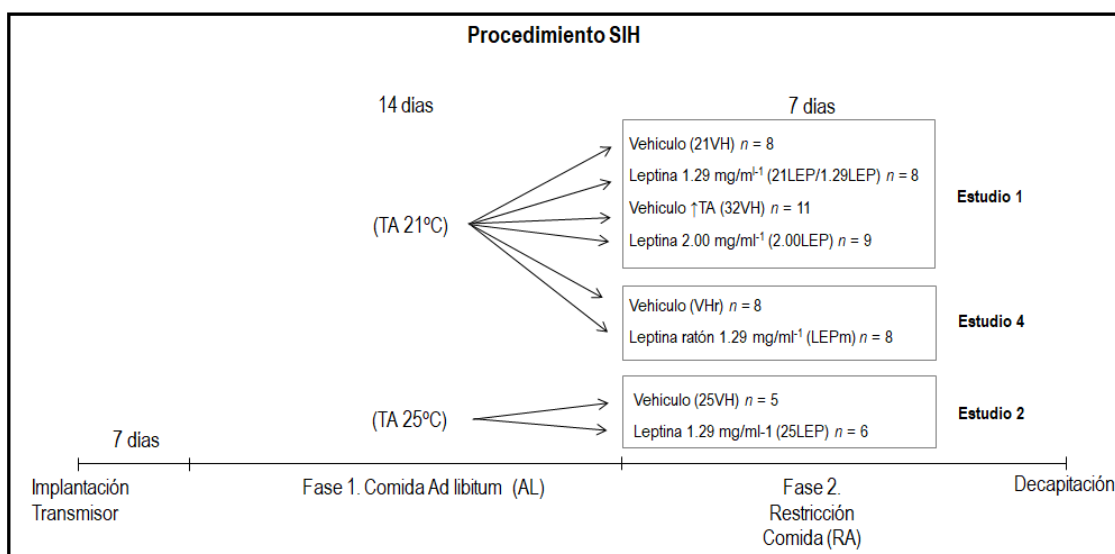


Figura 10. Detalle del procedimiento, de fases, condiciones y número de animales utilizados en el procedimiento de restricción de alimento.

En el tercer estudio realizado con este procedimiento pero que denominaremos Estudio 4 porque temporalmente se realizó en cuarto y último lugar, un grupo de animales es tratado con leptina de origen de ratón a la dosis estándar, el cual es comparado con un grupo tratado con vehículo, para descartar que el origen de la leptina influye sobre la hiperactividad. Tanto en la fase AL como en la fase RA, la temperatura ambiente se estableció en $21^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

Transcurridos siete días los animales de los tres estudios fueron sacrificados mediante decapitación para la extracción de tejidos, que fueron congelados en hielo seco o nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta su utilización.

Por otra parte, en la Figura 11 se detalla el esquema para el estudio de los efectos de la leptina en los animales que no sufrieron ninguna restricción de alimento y que para los cuales la alimentación ad libitum también se mantuvo durante la segunda fase. Al igual que en el anterior procedimiento, la primera fase (Fase Pretratamiento) comenzó cuando al octavo día las ratas fueron pesadas y trasladadas a las cajas con ruedas de actividad, permaneciendo con acceso a la rueda y a la comida 24 horas durante 14 días y con una temperatura ambiente que se estableció en $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. El peso corporal y la ingesta de los animales se monitorizó de la misma forma, diariamente entre las 10:30 y las 11:00 h, mientras que la actividad en la rueda y la temperatura corporal se registró minuto a minuto.

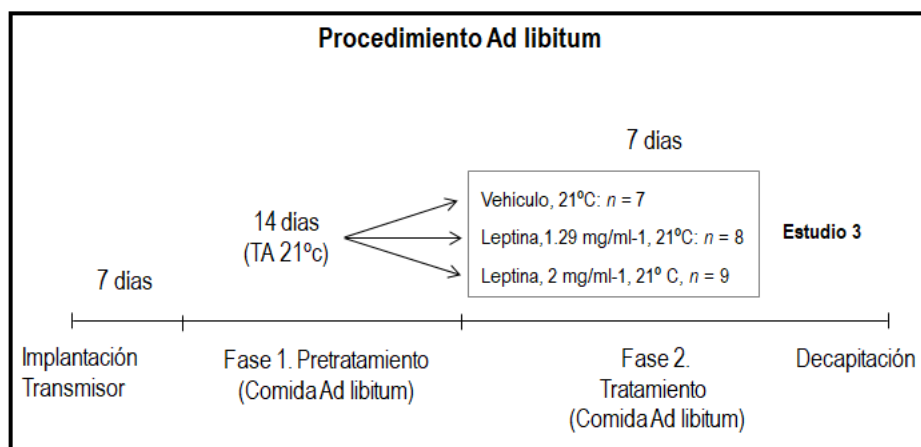


Figura 11. Detalle del procedimiento, de fases, condiciones y número de animales utilizados en el procedimiento de alimentación ad libitum.

Para la segunda fase (Fase Tratamiento), los animales fueron asignados a los grupos experimentales ajustados por el peso y el nivel de actividad pretratamiento. En el Día 0, las ratas fueron anestesiadas para la implantación subcutánea de las minibombas osmóticas (model 2001; Alzet Osmotic Pumps Corp) y se administró vehículo o leptina (suministrada por ProSpec-Tany Techno-Gene Ltd.) en los volúmenes que se especifican en la Figura 11 generando los grupos experimentales que se muestran. La temperatura ambiental para esta fase se mantuvo también en $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Por lo tanto, este procedimiento se corresponde con el tercer estudio en la línea temporal, que da lugar a tres grupos experimentales que nos van a permitir evaluar el efecto de la leptina sobre la ingesta: un grupo tratado con vehículo y dos grupos tratados con leptina, uno con la dosis estándar y otro con la dosis elevada. Además, este último grupo tratado con una dosis de 2 mg/ml^{-1} de leptina junto con el grupo tratado con la misma dosis, pero en restricción de alimento del Estudio 1, permitirán evaluar el efecto de esta nueva dosis sobre la hiperactividad.

De nuevo, transcurridos siete días todos los animales fueron sacrificados mediante decapitación para la extracción de tejidos, que fueron congelados en hielo seco o nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta su utilización.

2.4. ANÁLISIS DE LEPTINA EN SANGRE

Los niveles de leptina en suero, de los animales que forman los tres grupos principales del primer estudio (21VH, 21LEP y 32VH), fueron analizados a través de un kit ELISA (Linco Research St. Charles, MO, USA; Cat #EZRL-83K; sensibilidad 0.04 ng/ml).

2.5. ANÁLISIS DE PROTEÍNA POR WESTERN BLOT

Para determinar los niveles de expresión proteica de UCP1 en BAT se realizó la técnica de *western blot*. La corrección de Bonferroni se realizó para evitar errores de tipo 1 en todas las comparaciones múltiples

2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se expresaron como media \pm S.E.M. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando IBM SPSS Statistics versión 21.0 (IBM Corp. Armonk, NY, EE. UU.). Para analizar las variables de peso corporal, actividad en la rueda y temperatura corporal se empleó un análisis de varianza de medidas repetidas a lo largo de los días (ANOVA) tomando como factor independiente la variable de pertenencia al grupo experimental (GRUPO). El ANOVA de una vía fue aplicado para comparar las posibles diferencias de peso cuando entran en experimento, al inicio de la fase AL/Pretratamiento, al final de la fase AL/Pretratamiento y al principio de la fase RA/Tratamiento. También se utilizó para analizar la ganancia de peso acumulada en cada una de las fases experimentales, los niveles de leptina en sangre y los niveles proteicos de UCP1 en BAT. La prueba *t* de Student se empleó cuando se necesitó comparar una variable entre dos de los grupos y la prueba de Chi-cuadrado para la variable de porcentaje de actividad diurna. Para evitar el error tipo 1 se aplicó la corrección de Bonferroni en todas las comparaciones múltiples. Cuando la Prueba de Esfericidad de Mauchly fue significativa, se aplicó la corrección Greenhouse-Geisser. Para todos los análisis se tomó un alfa de 0.05.

3. RESULTADOS

Cómo ya hemos comentado en la introducción de este capítulo, a lo largo de este se intentará dar respuesta a las diferentes causas que podrían estar originando la ausencia de efecto de la leptina sobre la hiperactividad de ratas expuestas al procedimiento SIH, las cuales son: la excesiva actividad basal, el mal funcionamiento de las minibombas osmóticas o de la propia leptina, una dosis insuficiente o el origen de la leptina recombinante administrada.

3.1. ¿UNA EXCESIVA ACTIVIDAD BASAL IMPIDE QUE LA LEPTINA EJERZA EL EFECTO INHIBIDOR SOBRE LA HIPERACTIVIDAD?

Para comprobar si un alto nivel de actividad basal podría estar enmascarando el efecto inhibitorio de la leptina sobre esta, se decidió reducir la fase AL a 14 días, que como ya hemos explicado anteriormente, la actividad de las ratas en el estudio del anterior capítulo al Día 14 de la fase AL fue similar al mostrado por las ratas del estudio original en el Día 28. Entonces,

se realizó un estudio de reversión de la hiperactividad idéntico al mostrado en el capítulo anterior, pero con la diferencia de que la línea de base constó de 14 días y no de 28, por lo que los grupos experimentales del Estudio 1 analizados con este propósito serán el grupo tratado con vehículo, el tratado con leptina en la dosis estándar y el grupo tratado con vehículo y calor. Cómo se pudo ver en la Figura 10, en este estudio también incluimos un grupo tratado con una dosis más elevada de leptina, cuyos datos se describirán más adelante. También se comentó la influencia de la temperatura ambiente del laboratorio sobre los niveles de actividad desarrollada por las ratas, por lo que los animales del Estudio 2 serán comparados con los tres grupos experimentales mencionados del Estudio 1. Es decir, se añadieron al análisis dos grupos experimentales más, uno tratado con vehículo y otro tratado con leptina, que fueron expuestos a una temperatura ambiente de 25°C durante la fase AL y la fase RA del procedimiento. Primero se describirán los resultados de la fase AL y a continuación los de la fase RA. Al igual que en el estudio de prevención de la hiperactividad en el modelo SIH con los 28 días completos, se analizó el ciclo circadiano de la actividad y la temperatura corporal.

3.1.1. Primera Fase con comida ad libitum (AL)

En la Figura 12A se representa la actividad media diaria. El ANOVA de medidas repetidas mostró que los animales no estabilizaron la carrera en 14 días, sino que esta continuó aumentando con el paso de los días, $F(1.5, 52.7) = 29.138$; $p < 0.0001$. Además, la interacción fue significativa, $F(6.2, 52.7) = 2.284$; $p = 0.048$, lo que indicó que este aumento de la actividad es mucho menos pronunciado para las ratas con una temperatura ambiente de 25°C en comparación con la de 21°C, dando lugar a diferencias significativas, $F(4, 34) = 6.705$; $p < 0.0001$. Por lo tanto, el aumento de la temperatura ambiente hasta 25°C durante la fase AL fue suficiente para reducir significativamente la actividad de los animales. Por otro lado, no hubo diferencias entre los animales alojados a 21°C y los que posteriormente fueron alojados a 32°C en la segunda fase RA (todas las $p > 0.05$).

Como se muestra en la Figura 12B, el peso corporal también aumentó a lo largo de la fase AL, $F(1.9, 66.1) = 669.515$; $p < 0.0001$, sin diferencias entre los grupos, $F(4, 34) = 0.403$; $p = 0.805$. Tampoco se observaron diferencias de peso en el momento en que las ratas entraron en el experimento (Día -14), $F(4, 34) = 1.434$; $p = 0.244$, ni cuando la fase AL terminó (Día -1), $F(4, 34) = 0.902$; $p = 0.473$. Por otro lado, no se detectaron diferencias en la ganancia de peso corporal, $F(4, 34) = 2.030$; $p = 0.112$, representada en la Figura 13A.

Con respecto a la temperatura corporal, representada en la Figura 12C, no se detectaron diferencias entre los grupos, aunque el efecto principal mostró una tendencia, $F(4, 33) = 2.343$; $p = 0.075$. Esta se debió a que el grupo 21VH mostró una temperatura corporal más alta, aunque solo alcanzó la significación con respecto al grupo 25VH, $p = 0.045$. Resulta interesante detenerse en la evolución de la temperatura corporal de los animales mantenidos a una temperatura ambiente de 25°C. Un ANOVA de medidas repetidas sólo para estos dos grupos indicó que la temperatura corporal de estos animales desciende con el paso de los días, $F(2.4, 22.2) = 18.134$; $p < 0.0001$, por igual en ambos grupos, $F(1, 9) = 2.670$; $p = 0.137$. Pero si restringimos el ANOVA de medidas repetidas a la segunda semana de la fase AL (del Día -7 al Día -13) observamos que la temperatura corporal dejó de descender y se estabilizó, $F(5, 45) = 0.438$; $p = 0.820$, a pesar de una nueva caída el Día -14, lo que sugiere un proceso de adaptación a la nueva temperatura ambiente de 25°C, ya que durante el período anterior de recuperación de la cirugía (ver apartado 2.1), los animales estaban alojados a 21°C.

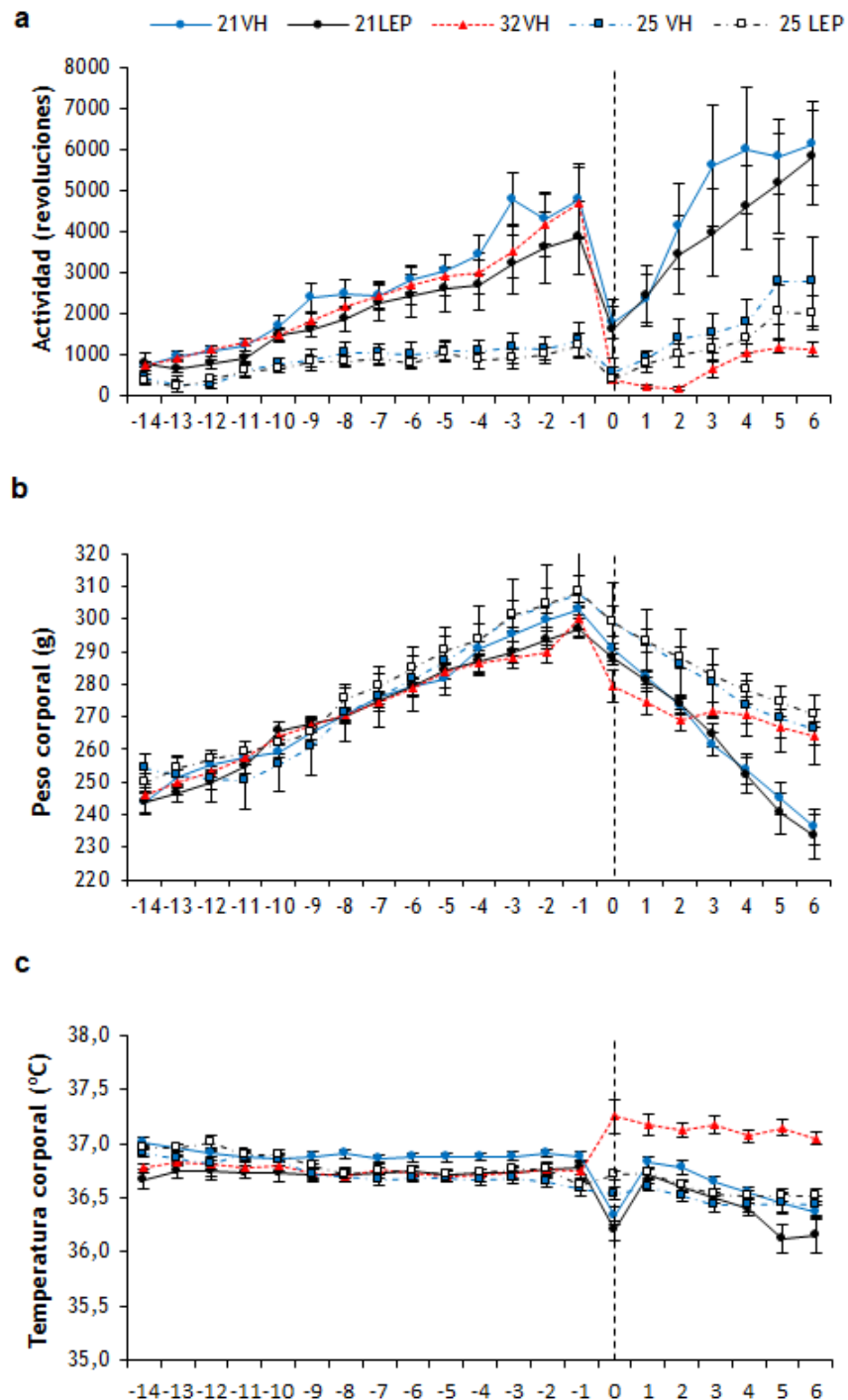


Figura 12. Actividad diaria en la rueda (A), peso corporal (B) y temperatura corporal (C) durante la fase ad libitum (Día -14 a Día -1) y durante la fase de restricción de alimento (Día 0 a Día 6). La línea vertical punteada separa las dos fases del experimento. Todos los datos se expresan como media \pm SEM.

Por último, la ingesta aumentó a lo largo de toda la fase AL, $F(4.5, 154.8) = 67.832$; $p < 0.0001$. Como se puede observar en la Figura 13B, las ratas con una temperatura ambiente a 25°C tuvieron un aumento de la ingesta más lento que las ratas a 21°C , $F(18.2, 154.8) = 4.398$;

$p < 0.0001$, lo que dio lugar a diferencias entre los grupos, $F(4, 34) = 2.987$; $p = 0.032$, aunque el análisis post-hoc reveló que estas diferencias se debieron únicamente entre los grupos 21VH y 25VH, $p = 0.036$. Por otro lado, cuando se realizó un ANOVA de medidas repetidas para la última semana de la fase ad libitum (del Día -7 al Día -14), estas diferencias entre los grupos desaparecieron, $F(4, 34) = 1.652$; $p = 0.184$.

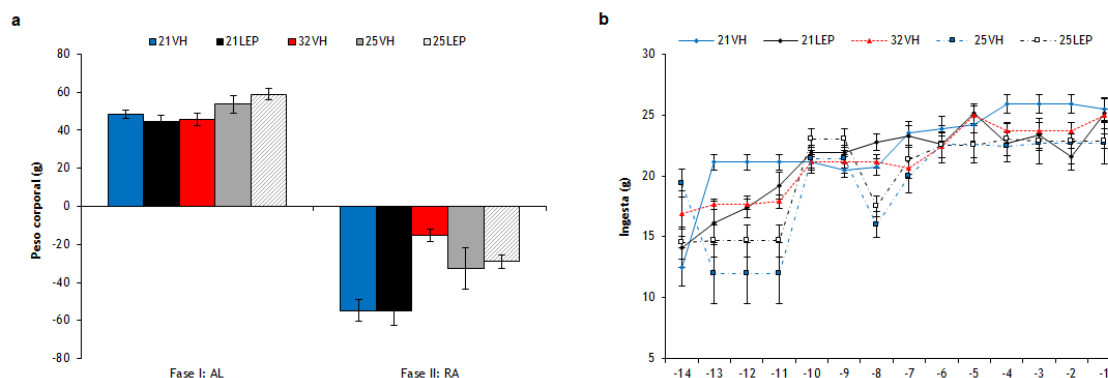


Figura 13. Ganancia de peso corporal acumulada durante la primera fase ad libitum (AL) y durante la fase de restricción de alimento (RA) (A). Ingesta durante la primera fase ad libitum (AL) (B). Los grupos representados son los tres grupos del Estudio 1 (21VH, 21LEP y 32VH) y los dos grupos del Estudio 2 (25VH, 25LEP). Todos los datos se expresan como media \pm SEM.

En la Tabla 13 se puede observar como la media diaria de ingesta durante la primera semana de la fase AL, es menor en las ratas a una temperatura ambiente de 25°C, efecto que desaparece en la segunda semana. Nuevamente, estos datos revelan un proceso de adaptación a la nueva temperatura ambiente, tal y como ocurrió con la temperatura corporal.

	Día -14 a Día -1	Día -7 a Día -1
21VH	22.37* \pm 0.95	25.00 \pm 0.54
21LEP	21.24 \pm 0.88	21.51 \pm 0.64
32VH	21.28 \pm 0.75	23.45 \pm 0.60
25VH	19.27 \pm 1.33	22.23 \pm 1.50
25LEP	20.00 \pm 0.67	22.57 \pm 0.76

Tabla 15. Media y SEM de la ingesta diaria (g/día) de todos los grupos experimentales durante la fase ad libitum completa (Día -14 a Día -1) y durante la última semana de la fase ad libitum (Día -7 a Día -1). * $p < 0.05$ 21VH vs 25VH.

3.1.2. Segunda Fase de Restricción de alimento (RA)

Nuevamente, la cirugía para la implantación de las minibombas osmóticas produjo un descenso de la actividad y la temperatura corporal, al igual que ocurrió en el estudio del anterior capítulo. En cuanto a la actividad, esta se recuperó entre uno y dos días, en los animales mantenidos a 21°C y 25°C, mientras que los animales calentados a 32°C no mostraron el rebote de actividad a niveles basales (Figura 12A). Por otro lado, el descenso en la temperatura corporal fue menos pronunciado para las ratas alojadas a 25°C y 32°C en comparación con las ratas mantenidas a 21°C, ya que sólo mostraron un descenso de la temperatura durante las primeras horas después de la cirugía que no afectaron a la media diaria.

Con respecto a la actividad en la rueda, representada en la Figura 12A, el ANOVA de medidas repetidas detectó diferencias significativas en función de la temperatura ambiente a la que fueron expuestas las ratas, $F(4, 34) = 6.705$; $p < 0.0001$. Mientras que las ratas mantenidas a 21°C aumentaron la carrera, las ratas alojadas a 32°C la redujeron con respecto a la fase AL, lo que supuso que en el último día de la fase RA las ratas 32VH corrieron cinco veces menos que las ratas 21VH y 21LEP (ambas $p < 0.0001$). Por otra parte, las ratas alojadas a 25°C corrieron menos que las ratas mantenidas a 21°C durante todos los días de restricción (Del Día 0 al Día 7, $p < 0.01$), y corrieron más que las ratas calentadas a 32°C (todos los días $p < 0.05$, excepto los Días 0 y 5). No se detectaron diferencias significativas en función del tratamiento recibido tanto en las ratas alojadas a 21°C como a 25°C.

En cuanto al peso corporal (Figura 12B), a pesar de que el ANOVA de una vía detectó diferencias significativas el día en que comienza la fase de restricción (Día 0), $F(4, 34) = 2.771$; $p = 0.043$, los análisis post-hoc indicaron que estas diferencias se deben únicamente a un menor peso de las ratas 32VH con respecto a las ratas 25LEP, $p = 0.054$. Un ANOVA de medidas repetidas mostró una interacción significativa, $F(8.5, 72.4) = 10.937$; $p < 0.0001$, por lo que la pérdida de peso de los animales varió en función de la temperatura ambiente a la que fueron expuestos, lo que dio lugar a diferencias significativas, $F(4, 34) = 4.489$; $p = 0.005$. Análisis post-hoc revelaron en primer lugar que no se detectaron diferencias significativas en función del tratamiento con vehículo o leptina tanto en las ratas a 21°C como a 25°C. Los animales alojados a 32°C mostraron una pérdida de peso más lenta y menos pronunciada que los animales mantenidos a 21°C, $F(1, 26) = 5.025$; $p = 0.034$. Por otro lado, los animales a 25°C también mostraron una pérdida de peso menos pronunciada que los animales a 21°C, $F(1, 25) = 16.928$; $p < 0.0001$, y también que los animales alojados a 32°C, $F(1, 21) = 4.395$; $p = 0.048$. Debido a que el grupo 32VH perdió peso desde que comenzó la fase RA hasta el Día 2 y después lo mantuvo estable, se decidió realizar un ANOVA restringido a los últimos cuatro días de la semana. Esto mostró unas diferencias más marcadas entre los animales alojados a 21°C y 32°C, $F(1, 26) = 19.422$; $p < 0.0001$, y no se detectaron diferencias con respecto a los animales a 25°C, $F(1, 21) = 1.357$; $p = 0.257$. Las diferencias detectadas en el peso corporal se traducen de igual forma en la ganancia de peso acumulada, representada en la Figura 13A. Así, se encontraron diferencias significativas en función de la temperatura ambiente, $F(4, 34) = 14.797$; $p < 0.0001$. Igualmente, no se detectaron diferencias en la ganancia en función del tratamiento con vehículo o leptina en los animales a 21°C y 25°C (ambas $p > 0.05$) y los animales a 32°C mostraron una menor pérdida de peso que los animales a 21°C (ambas $p < 0.05$). Y nuevamente, las ratas a una temperatura ambiente de 21°C pierden más peso que las ratas a 25°C (todas las $p < 0.05$), y aunque los post-hoc no detectaron diferencias significativas con respecto a los animales a 32°C, un análisis con t de Student reveló que las ratas a 25°C pierden más peso, $t(21) = 3.965$; $p = 0.001$.

En la Figura 12C podemos observar diferencias significativas en la temperatura corporal, $F(4, 33) = 22.587$; $p < 0.0001$. Las ratas alojadas a 32°C tienen una temperatura corporal significativamente más elevada que las ratas alojadas a 21°C y 25°C (ambas $p < 0.0001$). Por otro lado, si bien parece que la temperatura corporal de los animales alojados a 25°C presenta un descenso menos pronunciado que los animales mantenidos a 21°C, únicamente los animales 21LEP mostraron una menor temperatura corporal con respecto al grupo 25LEP, $p = 0.03$. Respecto a las diferencias en la temperatura corporal en función del tratamiento recibido, vehículo o leptina, en los animales mantenidos a 21°C se detectó una tendencia a una menor temperatura por parte de los animales tratados con leptina, $p = 0.07$, mientras que en los animales a 25°C, no se detectaron diferencias significativas, $p = 0.692$.

3.1.3. Ciclo circadiano de la actividad y la temperatura corporal

En la Figura 14 aparece representada la evolución de la actividad y la temperatura corporal en función de las horas de luz y de oscuridad durante la fase AL para los animales que han sido alojados desde un primer momento a una temperatura ambiente de 21°C (panel superior) y a una temperatura ambiente de 25°C (panel inferior). Como ya comentamos en el anterior capítulo, las ratas son animales nocturnos y nuevamente durante la fase AL del procedimiento, las ratas corren más durante las horas de oscuridad y en consecuencia muestran una temperatura corporal más alta. Este efecto parece retrasarse en los animales expuestos a 21°C ya que su temperatura corporal es similar en ambos períodos, luz y oscuridad, hasta que en la segunda semana de la fase esta aumenta durante la noche. Además, como ya habíamos comentado anteriormente, los animales alojados a 25°C mostraron una reducción de la temperatura corporal durante la primera semana de la fase AL que posteriormente se estabilizó durante la segunda semana para adaptarse a esta nueva temperatura ambiente. Este proceso no se restringe a un período en concreto, sino que ocurre tanto en las fases de luz como en la de oscuridad.

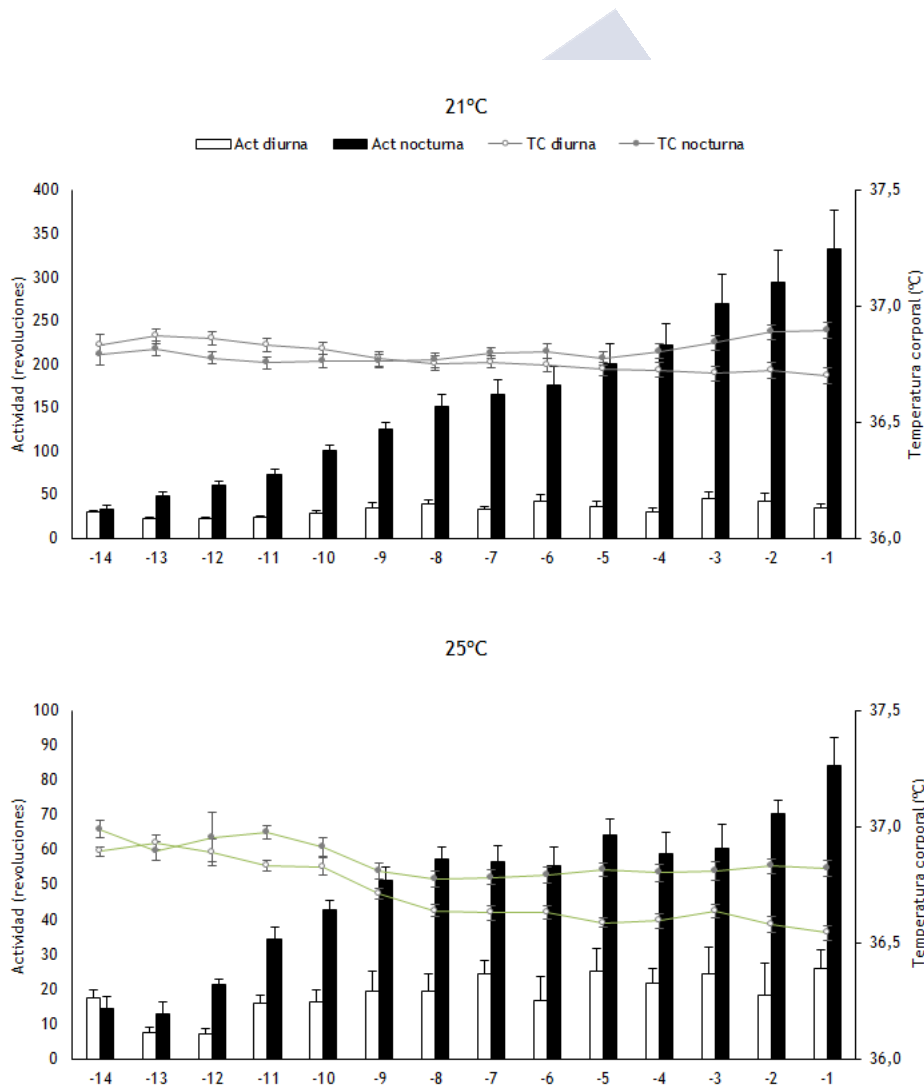


Figura 14. Actividad media diaria y temperatura corporal durante la fase de luz y la fase de oscuridad para los grupos experimentales mantenidos a 21°C (panel superior) y para los grupos experimentales mantenidos a 25°C (panel inferior) en la fase ad libitum (AL). Todos los datos se expresan como media \pm SEM

Al contrario de lo que ocurrió en el estudio de prevención de la hiperactividad con una línea de base de 28 días, las ratas mantenidas a 21°C durante la fase RA mostraron un patrón de distribución de la actividad diferente al de la fase AL. Así, mientras la actividad durante la fase AL se producía en su mayor parte durante la noche, con una proporción cercana al 80% respecto a la actividad diaria total, cuando los animales son sometidos a la restricción de alimento esta proporción se reduce entorno al 60%, independientemente de si fueron tratados con vehículo o con leptina, por lo que la actividad durante las horas de luz aumentó dos veces con respecto a la fase AL. Por el contrario, los animales alojados a 32°C mantuvieron su proporción de actividad nocturna estable a pesar de la restricción de alimento, tal y como se puede observar en la Tabla 16. Por otro lado, las ratas alojadas a 25°C también mostraron un cambio en la distribución de la actividad realizada, respecto a la anterior fase AL, cuando fueron sometidas a la restricción de alimento, al igual que ocurrió con las ratas mantenidas a 21°C. Pero a diferencia de estos, en las ratas alojadas a una temperatura ambiente de 25°C, el cambio fue más pronunciado ya que las tasas de actividad durante la noche se redujeron hasta una proporción del 40% respecto a la actividad total. Esto supone la exhibición de la mayor parte de la actividad diaria durante las horas de luz (Tabla 16). A pesar de la reducción de la proporción de actividad durante las horas de oscuridad, en los animales mantenidos a 21°C, estos continúan mostrando una mayor tasa de actividad durante la noche.

	Fase AL	Fase RA
21VH		57.4%
21LEP	82.35%	62.1%
32VH		76.7%
25VH		42.4%
25LEP	72.0%	40.8%

Tabla 16. Porcentaje de la ratio de actividad diaria durante la fase de oscuridad/actividad diaria total - O/(L+O)- durante la fase ad libitum (AL) y la fase de restricción (RA).

A continuación, nos centraremos en el efecto de la leptina y el aumento de la temperatura ambiente a 32°C sobre la actividad media diaria en cada período de luz y oscuridad y sobre la proporción de actividad diurna, que como ya explicamos en el capítulo anterior, se obtiene dividiendo la actividad media diurna entre el total de actividad diaria. La actividad media diurna y nocturna aparecen representados en la Figura 15, en los paneles A y B, respectivamente, mientras que la proporción de actividad diurna se representó en la Tabla 17 como un porcentaje. Nuevamente, encontramos los mismos resultados que los obtenidos en el estudio con 28 días de fase AL del capítulo anterior. Así, la leptina redujo significativamente la proporción de actividad diurna, con respecto a los animales tratados con vehículo, durante cinco de los seis días de la semana de restricción de alimento. Posteriormente, este efecto desaparece e incluso llegó a superar la proporción de actividad diurna de las ratas 21VH, alcanzando un 60% de actividad diaria total durante la fase de luz. En los animales alojados a una temperatura ambiente de 25°C volvemos a detectar el mismo efecto de la leptina sobre la proporción de actividad diurna, la cual se redujo durante los tres primeros días de la fase RA para después aumentar y superar a la proporción de actividad diurna de las ratas tratadas con vehículo en los dos últimos días. Por lo tanto, en estos animales a 25°C, el efecto inhibitorio de la leptina sobre la proporción de la actividad diurna es más breve.

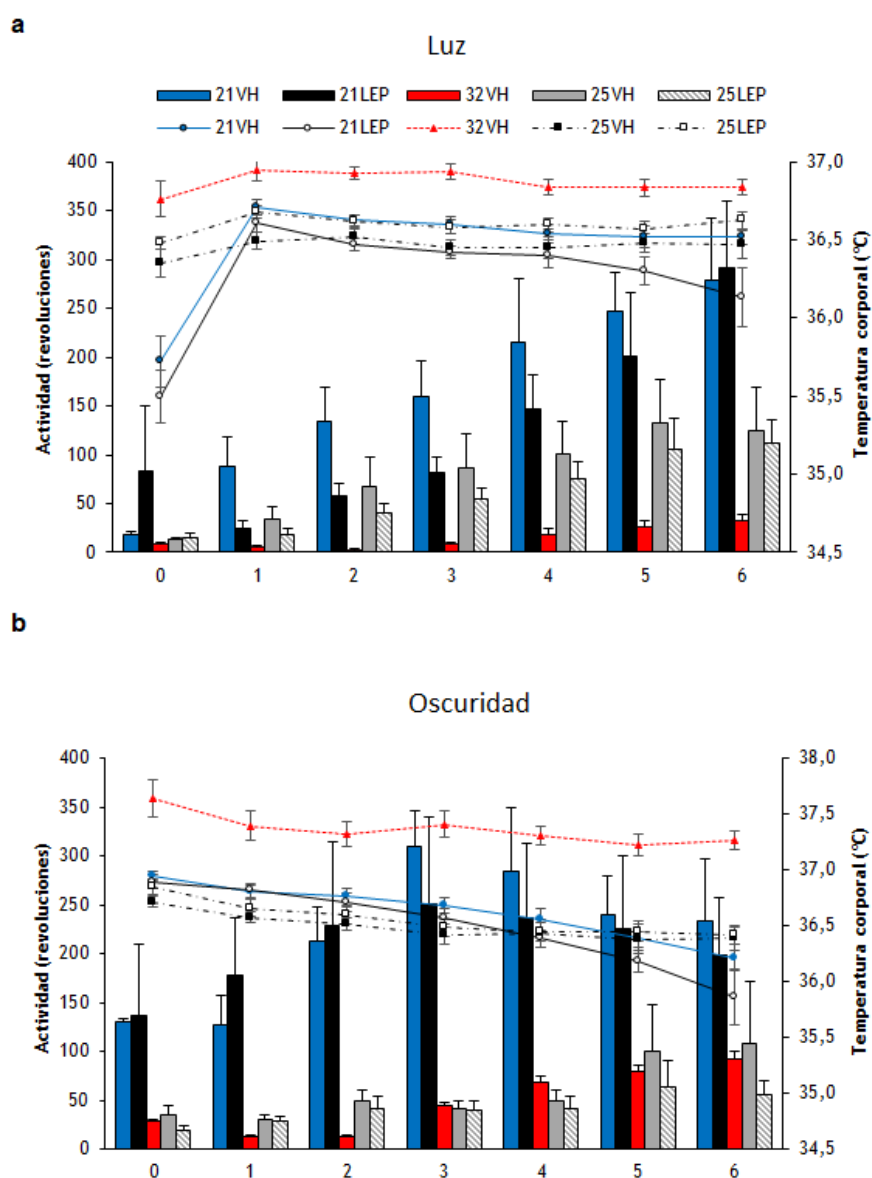


Figura 15. Actividad media diaria y temperatura corporal durante la fase de luz (A) y durante la fase de oscuridad (B) en la fase de restricción de alimento (RA). Todos los datos se expresan como media \pm SEM.

Por el contrario, no se detectaron diferencias en función del tratamiento recibido vehículo o leptina, en la actividad media diaria durante la fase de luz o la fase de oscuridad de los animales alojados a una temperatura ambiente de 25°C (Figura 15). Por otro lado, en los animales mantenidos a 21°C únicamente se detectó una reducción significativa en la actividad media diurna de las ratas 21LEP en comparación con las 21VH, durante los Días 1, 2 y 3 de la fase RA (todas las $p < 0.05$).

Con respecto a la temperatura corporal, todos los animales mantenidos a 21°C presentaron un pequeño aumento, de entre uno y dos décimas de grado, en las horas de oscuridad, mientras que en los animales expuestos a 25°C esto no se produjo y por lo tanto su temperatura corporal fue la misma en ambos períodos. Por otro lado, en los animales alojados a 32°C este aumento de la temperatura corporal durante la noche llegó a alcanzar el medio grado centígrado.

	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
21VH	---	41.0% ^{a,c}	38.7% ^{a,c}	33.9% ^{a,c}	43.1% ^{a,c}	50.8% ^{a,c}	54.5% ^a
21LEP	---	12.5%	20.5%	24.6% ^b	38.4% ^b	47.0% ^b	59.5% ^{b,c}
32VH	---	31.2% ^b	16.2%	15.4%	21.3%	25.2%	26.3%
25VH	--	53.2% ^d	57.6% ^d	68.1% ^d	67.2%	57.1%	53.6%
25LEP	--	39.0%	49.8%	58.3%	64.1%	62.3% ^d	66.6% ^d

Tabla 17. Porcentaje de la ratio de actividad diaria durante la fase de luz/actividad diaria total - L/(L+O)- durante la fase de restricción (RA). Los datos de actividad para el Día 0 fueron excluidos del análisis debido a la atenuación de la actividad por la implantación de la minibombas osmóticas. Abreviaturas: ^a. Diferencias significativas entre 21VH and 32VH. ^b. Diferencias significativas entre 21LEP and 32VH. ^c. Diferencias significativas entre 21VH and 21LEP. ^d. Diferencias significativas entre 25VH y 25LEP. Test de Chi cuadrado, todas las significaciones $p < 0.001$.

El análisis del ritmo circadiano de la temperatura corporal nos aporta un poco más de luz a los resultados obtenidos en el anterior apartado. En los animales mantenidos a 21°C, si bien habíamos detectado una tendencia a una menor temperatura corporal cuando fueron tratados con leptina, esto se debe a las diferencias detectadas durante las horas de luz. Así, los animales tratados con leptina mostraron una menor temperatura corporal que los animales tratados con vehículo en este período de luz, $p = 0.03$, mientras que en la fase de oscuridad no se detectaron diferencias significativas, $p = 0.466$, ni si quiera cuando el ANOVA de medidas repetidas se restringió a los dos últimos días. Por otro lado, las diferencias entre los animales tratados con leptina con una temperatura ambiente de 21°C y 25°C, se limitaban más claramente a las horas de luz, ya que la temperatura corporal de las ratas 25LEP fue superior a la de las ratas 21LEP a lo largo de seis de los siete días (todas las $p < 0.05$) de la fase de restricción, mientras que, durante la fase de oscuridad, únicamente durante el Día 6, $p = 0.018$.

3.2. EFECTO DE LA LEPTINA SOBRE LA INGESTA

Hasta el momento, los estudios realizados para replicar el efecto inhibitor de la leptina sobre la hiperactividad en el modelo SIH descrito por Exner et al. (2000), no tuvieron los resultados esperados. Así, la leptina no parece prevenir el aumento de actividad que se produce cuando un animal es sometido a restricción de alimento, tanto con una fase AL de 28 días de duración, tal y como describimos en el anterior capítulo, como cuando esta se redujo a dos semanas, ya sea con una temperatura ambiente estándar de 21°C o elevada a 25°C, para conseguir una actividad basal más reducida, lo cual hemos descrito en los anteriores apartados de este capítulo. Pero, aunque no se detectaron diferencias significativas en la actividad media diaria de los animales tratados con leptina en ninguno de estos estudios, sí se detectó de manera reiterada en cada uno de ellos una disminución de la proporción de actividad diurna, la cual representa una forma menos común de evaluar la actividad desempeñada por los animales. Por lo tanto, la leptina no tiene efecto sobre la actividad media diaria pero sí sobre la proporción de actividad realizada durante las horas de luz, el cual fue más marcado cuando los animales fueron expuestos a una fase AL de dos semanas de duración y a una temperatura ambiente de 21°C.

Además, en la Figura 16 se puede observar los niveles séricos para los grupos 21VH, 21LEP y 32VH, los cuales fueron diferentes para cada grupo, $F(2, 23) = 7.228$; $p = 0.004$. Los análisis post-hoc indicaron que, tal y como era de esperar, los animales tratados con leptina tenían más cantidad de leptina circulante en sangre que las ratas tratadas con vehículo, tanto alojadas a 21°C, $t(12) = 3.011$; $p = 0.011$, como alojadas a 32°C, $t(18) = 2.341$; $p = 0.031$. Además, las

ratas 32VH tenían niveles más elevados de leptina en sangre que las ratas 21VH, $t(16) = 2.831$; $p = 0.012$, lo cual indica que las minibombas osmóticas están difundiendo de manera correcta la leptina durante los siete días del procedimiento, aspecto que no pudimos comprobar en el estudio del anterior capítulo debido a la pérdida de las muestras de sangre.

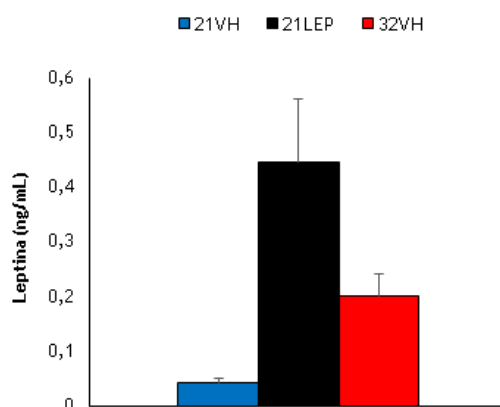


Figura 16. Niveles circulantes de leptina en sangre (ng/ml). Todos los datos se expresan como media \pm SEM.

Por otro lado, debido a la forma de presentación y medida del consumo de alimento inherente al modelo SIH, no permite observar el efecto inhibitorio que la leptina ejerce sobre la ingesta y que proporciona una evidencia más de la ausencia de resistencia a esta hormona por parte de los animales que la reciben. Así, con el objeto de determinar el efecto inhibitor de la leptina sobre la ingesta, esta se monitorizó de dos maneras: durante los primeros 90 minutos después de recibir la ración de comida en las ratas durante la fase RA y a través de la realización de un estudio paralelo para evaluar la ingesta en ratas alimentadas ad libitum.

Con respecto a la evaluación de la ingesta durante los 90 primeros minutos tras recibir la ración de comida, esta se realizó en los animales que fueron sometidos al modelo SIH con una línea base de dos semanas y que durante la fase RA fueron mantenidos a 21°C, 25°C y 32°C. En la Figura 17, se puede ver como la ingesta durante este período de tiempo aumenta con el paso de los días $F(5, 170) = 42.488$; $p < 0.0001$ con diferencias entre los grupos, $F(4, 34) = 22.026$; $p < 0.0001$. Los análisis post-hoc revelaron que en las ratas mantenidas a 21°C, las ratas tratadas con leptina muestran una tendencia a comer menos que las ratas tratadas con vehículo, $p = 0.06$. Pero si realizamos el ANOVA de medidas repetidas para los primeros cinco días de la fase RA (del Día 0 al Día 4), la ingesta de las ratas 21LEP es significativamente menor que el de las ratas 21VH, $p = 0.036$. Por otro lado, las ratas alojadas a 32°C comieron significativamente menos que las ratas alojadas a 21°C o 25°C (todas las $p < 0.0001$ a excepción del grupo 25LEP, $p = 0.06$). En cuanto a la ingesta de las ratas mantenidas a una temperatura ambiente de 25°C a lo largo de todo el experimento, si bien parece que la leptina tiene un efecto sobre la ingesta durante estos 90 minutos, puesto que la cantidad de alimento ingerida a lo largo de la semana en ese período de tiempo fue menor en las ratas 25LEP que en las ratas 25VH ($32.0 \text{ g} \pm 4.7 \text{ g}$ vs $39.6 \text{ g} \pm 2.9$, respectivamente), no se detectaron diferencias significativas, $p = 0.475$. Tampoco se detectaron diferencias significativas con respecto a las ratas mantenidas

a 21°C (todas las $p > 0.05$). Por lo tanto, incluir la monitorización de la ingesta durante este periodo de tiempo supone una innovación en el modelo SIH que nos permitió detectar el efecto inhibitor de la leptina sobre la ingesta de animales a restricción de alimento, aunque este fue breve y limitado a un par de días de la semana de restricción.

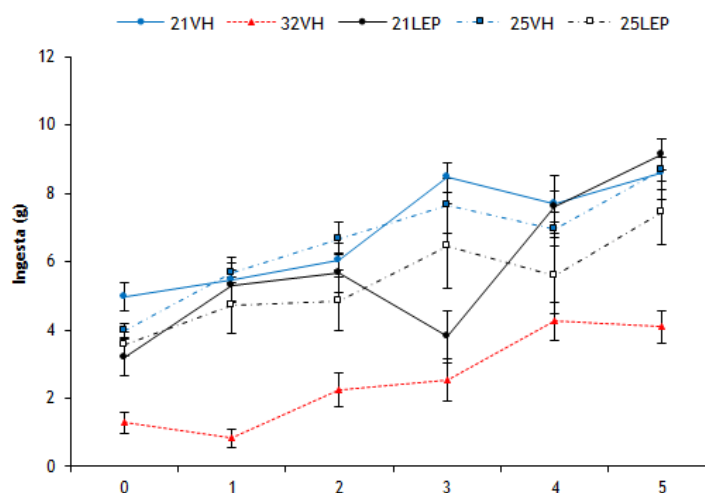


Figura 17. Ingesta durante los primeros 90 minutos después de recibir la ración de comida en la fase RA. Los grupos representados son: 21VH, 21LEP, 32VH, 25VH y 25LEP. Todos los datos se expresan como media \pm SEM.

3.2.1. Estudio de la ingesta en ratas ad libitum

A continuación, se presentarán los resultados para el estudio con ratas alimentadas ad libitum durante 21 días, un período de tiempo igual a las tres semanas de las ratas que pasan por el procedimiento SIH. Con el objeto de que los datos sean comparables a los mostrados en los apartados 3.1.1 y 3.1.2 se describirán los resultados de las dos primeras semanas de alimentación ad libitum (fase pretratamiento, idéntico al procedimiento SIH) y seguidamente se mostraran los resultados para la tercera semana (fase tratamiento) en la que los animales que continuaron con alimentación ad libitum fueron tratados con vehículo o leptina.

Durante la fase pretratamiento, como ya es sabido, los animales permanecen durante dos semanas con acceso a rueda de actividad y alimentación ad libitum las 24 horas del día, al igual que ocurre durante el procedimiento SIH. De hecho, en la Figura 18 podemos observar como la media diaria de la actividad en la rueda, el peso corporal, la ganancia de peso, la temperatura corporal y la ingesta para todos los grupos experimentales que componen el Estudio 1, analizado anteriormente, y el Estudio 3 que será analizado a continuación (ver apartado 2.3 Procedimiento), son exactamente iguales durante esta primera fase, tal y como revelaron los ANOVA realizados para cada una de estas variables (Tabla 18). En estos resultados están incluidos un grupo experimental adicional en cada estudio, ambos tratados con leptina a una dosis más elevada de 2 mg/ml^{-1} , pero en el que, durante la segunda fase del procedimiento, uno fue sometido a restricción de alimento (Estudio 1) y otro continuó con alimentación ad libitum (Estudio 3). Por cuestiones de simplicidad experimental han sido incluidos en cada uno de los

estudios, pero sus resultados serán descritos posteriormente cuando analicemos el efecto del aumento de la dosis de leptina (apartado 3.3).

Actividad (revoluciones)	F (1, 59) = 0.320; p = 0.574
Peso corporal (g)	F (1, 59) = 3.502; p = 0.066
Ganancia de peso (g)	t (59) = -1.182; p = 0.242
Temperatura corporal (°C)	F (1, 54) = 2.189; p = 0.145
Ingesta (g)	F (1, 59) = 1.820; p = 0.182

Tabla 18. Valores de F y p para el efecto principal de los ANOVA de medidas repetidas y valor de t y p de la prueba t de Student para los Estudios 1 y 3. El ANOVA de medidas repetidas incluye las variables actividad, peso corporal, temperatura corporal e ingesta, la prueba t de Student incluye la variable ganancia de peso.

Centrándonos en los grupos experimentales realizados para estudiar el efecto de la leptina sobre la ingesta de ratas alimentadas ad libitum, tampoco se han detectado diferencias entre ellos durante la fase pretratamiento, cuando aún no habían recibido la leptina o el vehículo. Estos resultados se pueden observar en las Figura 19 y 20 y cuyos valores de F y p se muestran en la Tabla 19.

Actividad (revoluciones)	F (1, 13) = 0.004; p = 0.953
Peso corporal (g)	F (1, 13) = 0.007; p = 0.934
Ganancia de peso (g)	t (13) = 1.480; p = 0.163
Temperatura corporal (°C)	F (1, 11) = 2.185; p = 0.167
Ingesta (g)	F (1, 13) = 0.102; p = 0.755

Tabla 19. Valores de F y p para el efecto principal de los ANOVA de medidas repetidas y valor de t y p de la prueba t de Student, durante la fase ad libitum (AL). El ANOVA de medidas repetidas incluye las variables actividad, peso corporal, temperatura corporal e ingesta, la prueba t de Student incluye la variable ganancia de peso

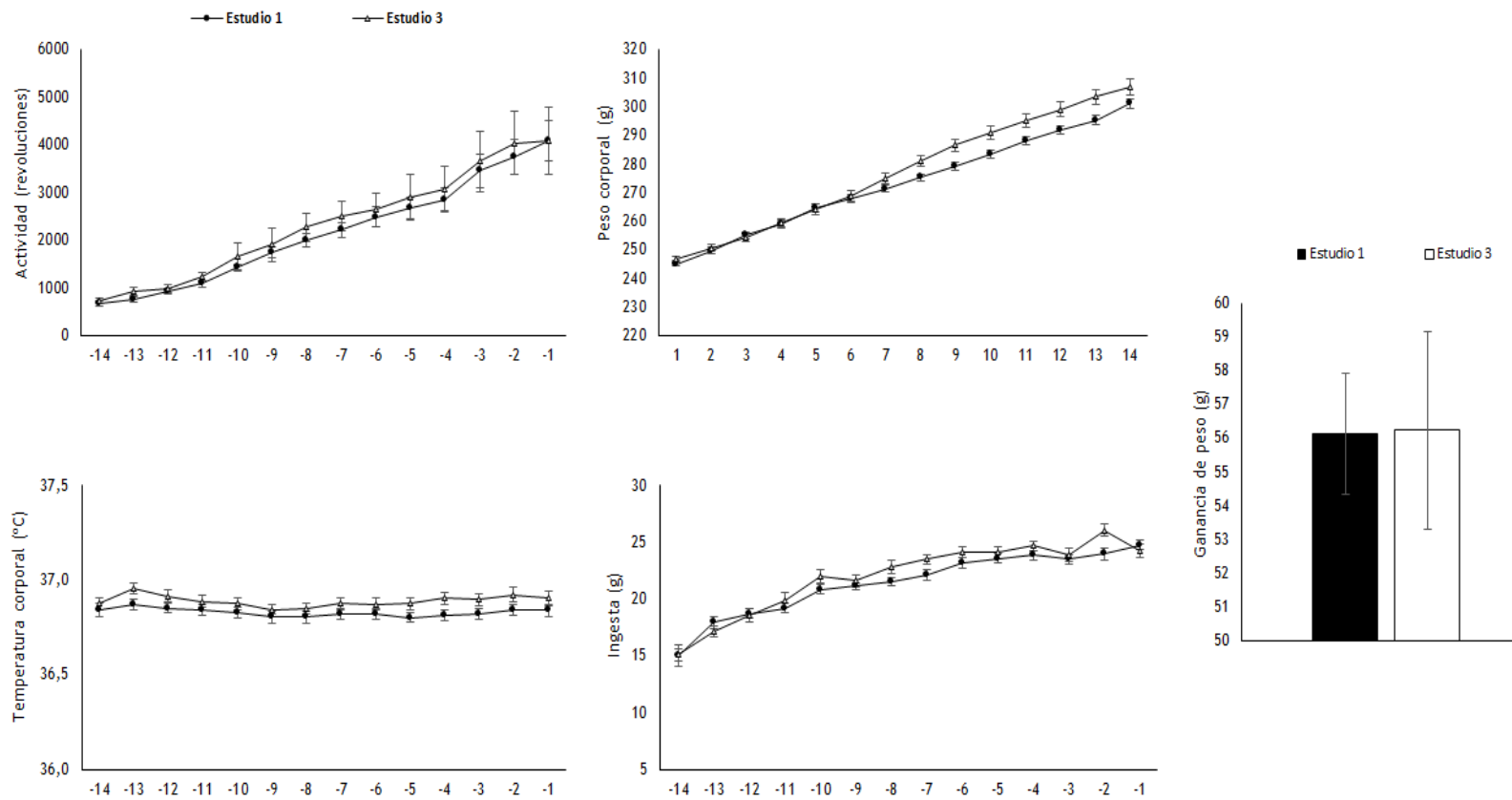


Figura 18. Actividad diaria en la rueda, peso corporal, temperatura corporal, ingesta y ganancia de peso corporal durante la fase AL (Día -14 a Día -1) para los Estudios 1 y 3. Todos los datos se expresan como media \pm SEM.

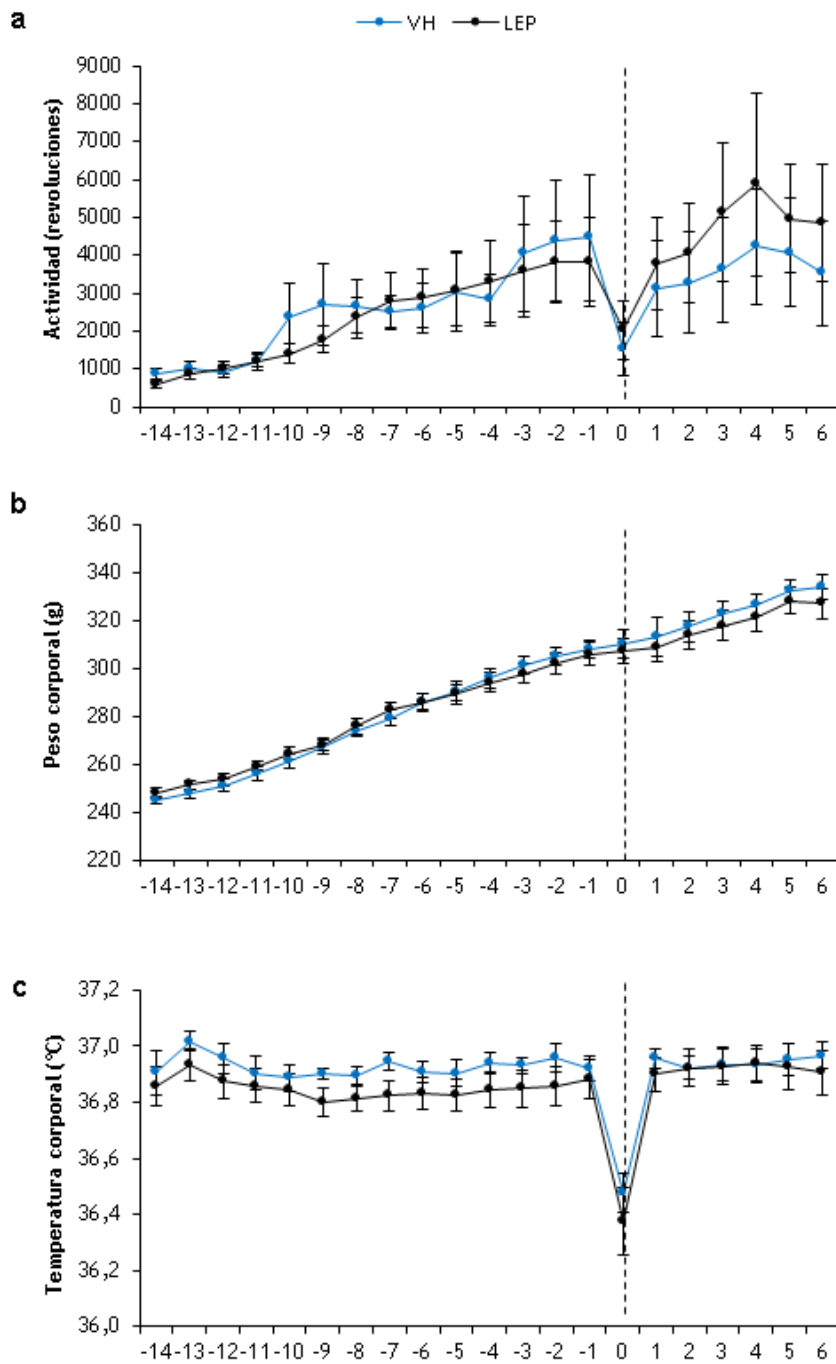


Figura 19. Actividad diaria en la rueda (A), peso corporal (B) y temperatura corporal (C) durante la fase pretratamiento (Día -14 a Día -1) y durante la fase de tratamiento (Día 0 a Día 6). La línea vertical punteada separa las dos fases del experimento. Todos los datos se expresan como media \pm SEM.

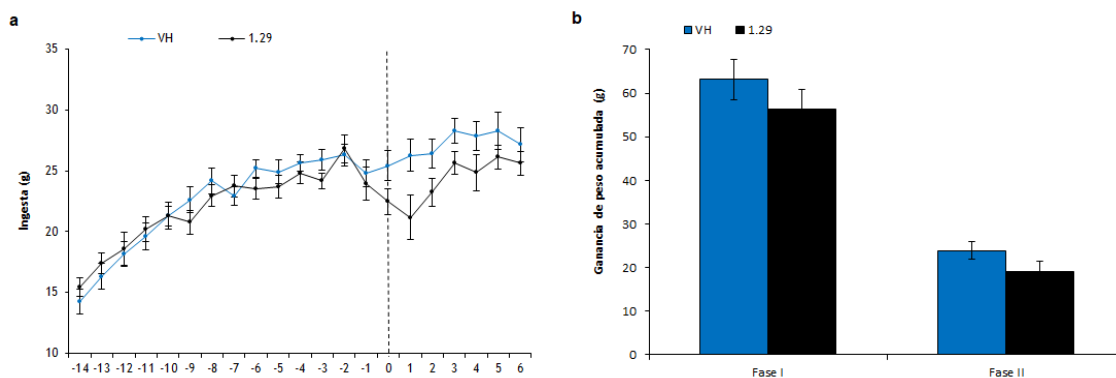


Figura 20. Ingesta (A) y ganancia de peso acumulada (B) durante la fase pretratamiento (Día -14 a Día -1) y durante la fase de tratamiento (Día 0 a Día 6). La línea vertical punteada separa las dos fases del experimento. Todos los datos se expresan como media \pm SEM.

Tras la operación para la implantación de las minibombas, comienza la segunda fase del experimento y, como viene sucediendo hasta ahora en todos los experimentos realizados, se produjo un descenso en la actividad y en la temperatura corporal a causa de la cirugía.

Durante esta fase de tratamiento, a pesar de no detectar diferencias significativas en la actividad, $F(1, 13) = 0.513$; $p = 0.486$, en la Figura 19A se puede apreciar que, si la leptina tiene algún efecto, éste no es el de inhibir la actividad, sino que parece tener un efecto facilitador, aunque la actividad total diaria entre los dos grupos no se diferencia significativamente (Tabla 20). Por otro lado, las ratas tratadas con vehículo no alcanzan su nivel de actividad pretratamiento.

	Día -1	Día 6	t
VH	4463.29	3527.29	$t(7) = -1.520$; $p = 0.172$
LEP	4132.63	5301.25	$t(6) = 0.468$; $p = 0.656$

Tabla 20. Media de actividad en el último día de la fase pretratamiento (Día -1) y en el último día de la fase de tratamiento (Día 6) para las ratas tratadas con vehículo (VH) y las tratadas con leptina (LEP). Prueba t para muestras relacionadas.

Con respecto al peso corporal, en la Figura 19B se puede observar como las ratas continúan ganando peso con el paso de los días, $F(2.8, 37.0) = 49.390$; $p < 0.0001$, como era de esperar con la alimentación ad libitum, pero no se observaron diferencias en función del tratamiento recibido, $F(1, 13) = 0.446$; $p = 0.516$, ni tampoco en la ganancia de peso acumulada, $t(13) = 1.036$; $p = 0.319$ (Figura 20A).

Con respecto a la temperatura corporal (Figura 19C), tampoco se encontraron diferencias significativas, $F(1, 11) = 0.149$; $p = 0.707$.

Sin embargo, con respecto a la ingesta (Figura 20B), las ratas tratadas con leptina comieron menos que las ratas tratadas con vehículo, $F(1, 13) = 5.560$; $p = 0.035$, aunque a pesar de esta diferencia no tuvo repercusión sobre la ganancia de peso de los animales.

3.2.2. Ciclo circadiano de la actividad y la temperatura corporal

Nuevamente, los animales de este Estudio 3 mostraron una mayor actividad en la rueda durante las horas de oscuridad durante la fase pretratamiento (que es idéntica a la fase AL del procedimiento SIH) y una temperatura corporal más alta a partir de la segunda semana, tal y como se puede observar en la Figura 21.

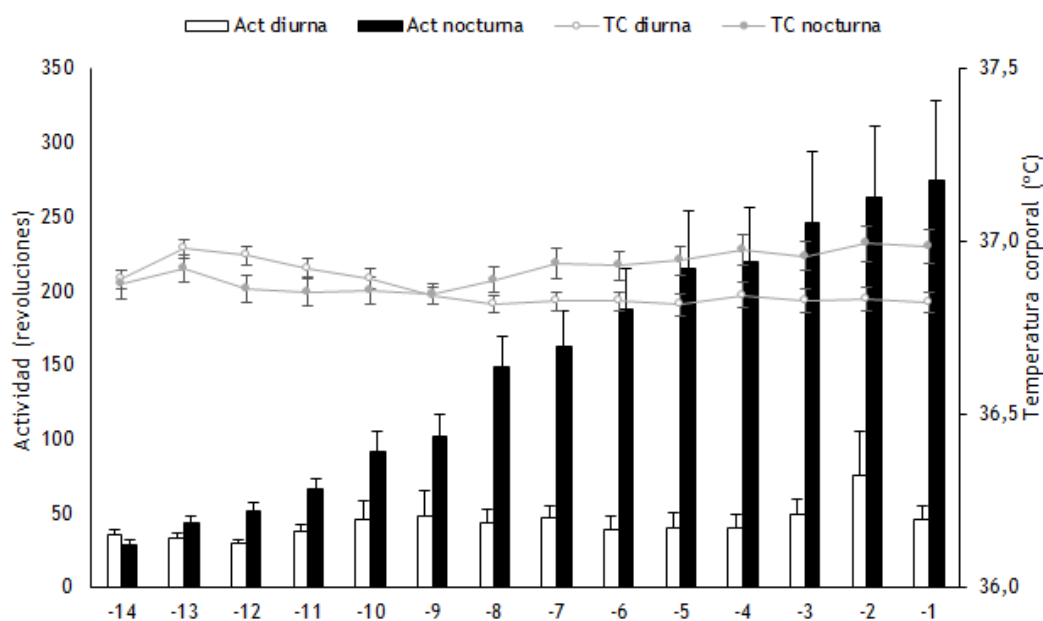


Figura 21. Actividad media diaria y temperatura corporal durante la fase de luz y durante la fase de oscuridad en la fase ad libitum (AL). Todos los datos se expresan como media \pm SEM.

Durante la fase de tratamiento, en la que los animales continúan con la alimentación ad libitum, pero son tratados con vehículo o leptina, en la Figura 22 aparece representada la actividad en la rueda y la temperatura corporal durante las horas de luz (panel superior) y las horas de oscuridad (panel inferior). Al continuar con acceso a la comida las 24 horas del día, estos animales continúan corriendo más durante la noche y presentaron una mayor temperatura corporal, por lo que no hay una desregulación del ritmo circadiano como sí ocurrió en las ratas sometidas a restricción de alimento y mantenidas a una temperatura ambiente de 21°C o 25°C. Por otro lado, como hemos descrito anteriormente, las ratas tratadas con leptina aumentan la actividad en la rueda superando la actividad desarrollada durante la fase pretratamiento, mientras que las ratas tratadas con vehículo se mantuvieron en los niveles de actividad basal sin superarla. En la Figura 22 se puede observar como este efecto de la leptina sobre la actividad de las ratas alimentadas ad libitum se relaciona con un aumento de la actividad media durante las horas de luz, aunque no se detectaron diferencias significativas, $F(1, 13) = 1.996$; $p = 0.181$. Sin embargo, si analizamos la proporción de actividad diurna con respecto a la actividad total, como ya hicimos con las ratas a restricción de alimento de los Estudios 1 y 2, observamos un aumento significativo por parte de las ratas tratadas con leptina durante toda la semana de tratamiento (Tabla 21). Así, la leptina muestra un efecto opuesto sobre la proporción de actividad diurna en función de la forma de alimentación de los animales, reduciéndola cuando son sometidos a restricción de alimento y aumentándola cuando la alimentación es ad libitum.

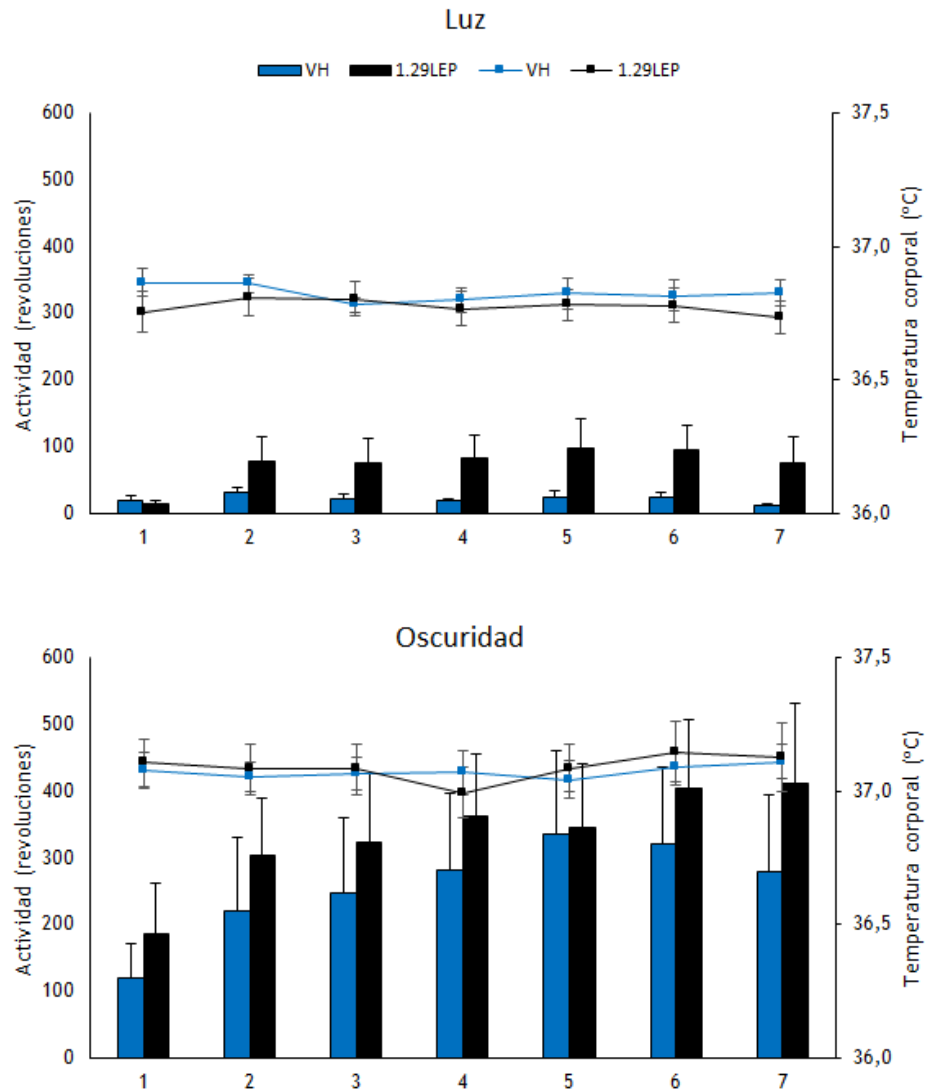


Figura 22. Actividad media diaria y temperatura corporal durante la fase de luz (panel superior) y durante la fase de oscuridad (panel inferior) en la fase de tratamiento de las ratas ad libitum. Todos los datos se expresan como media \pm SEM.

Por último, no se detectaron diferencias significativas en la temperatura corporal durante las horas de luz, $F(1, 11) = 0.851$; $p = 0.376$, o durante las horas de oscuridad, $F(1, 11) = 0.012$; $p = 0.914$, en función del tratamiento recibido, vehículo o leptina.

	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
VH	---	11.9%	8.2%	6.1%	6.8%	6.7%	4.2%
LEP	---	20.5% ^a	19.0% ^a	18.4% ^a	21.2% ^a	18.9% ^a	15.5% ^a

Tabla 21. Porcentaje de la ratio de actividad diaria durante la fase de luz/actividad diaria total - L/(L+O)- durante la fase de tratamiento. Los datos de actividad para el Día 0 fueron excluidos del análisis debido a la atenuación de la actividad por la implantación de la minibombas osmóticas. Abreviaturas: ^a. Diferencias significativas entre VH and LEP. Test de Chi cuadrado, todas las significaciones $p < 0.001$.

3.2.3. Niveles proteicos de UCP1 en el BAT

Debido a la implicación de la leptina sobre la termogénesis (Dodd et al., 2015; Pandit et al., 2017; Van Dijk, 2001), se analizaron los niveles de UCP1 en el BAT, responsable principal de la termogénesis adaptativa en este tejido, en cada uno de los grupos experimentales analizados hasta el momento, y que se enmarcan en los Estudios 1, 2 y 3.

La Figura 23 muestra los niveles de proteína de UCP1 en BAT. Con respecto a los animales mantenidos a una temperatura ambiente de 21°C en la fase AL, en la Figura 23A se puede observar, como las ratas 32VH presentaron unos niveles proteicos de UCP1 significativamente más reducidos en comparación con los animales mantenidos a 21°C, independientemente de si han recibido vehículo (p = 0.03) o leptina (p = 0.001). Además, los niveles de UCP1 en las ratas 21LEP están elevados con respecto a las ratas 21VH, p = 0.026.

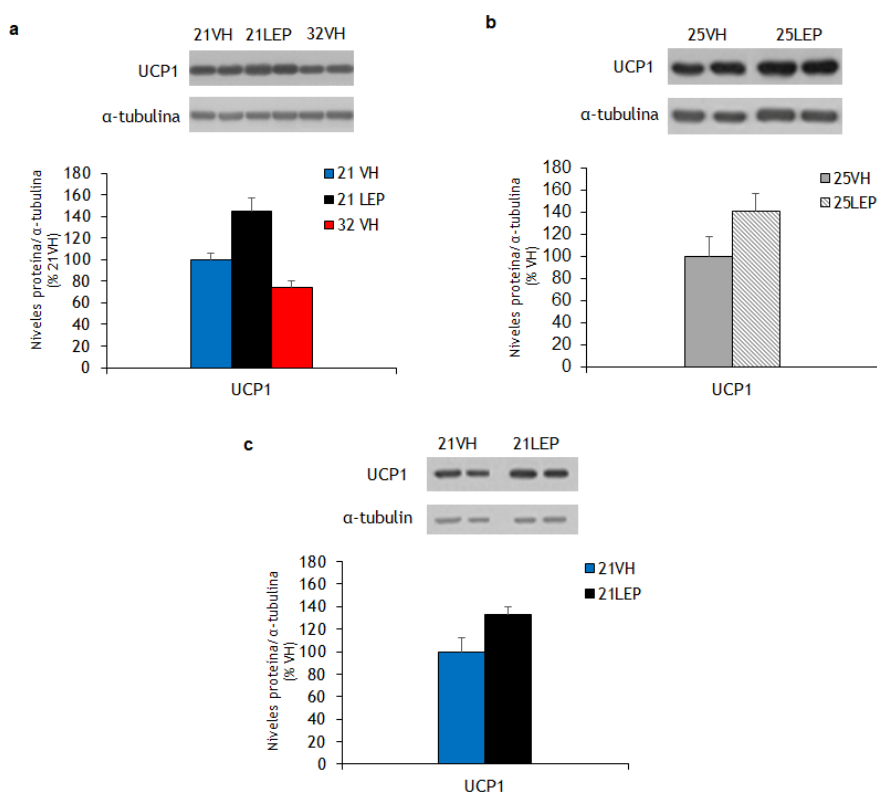


Figura 23. Niveles de proteína de UCP1 para los grupos con restricción de alimento 21VH, 21LEP y 32VH (panel inferior) e imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (panel superior) (A). Niveles de proteína de UCP1 para los grupos con restricción de alimento 25VH y 25LEP (panel inferior) e imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (panel superior) (B). Niveles de proteína de UCP1 para los grupos con alimentación ad libitum VH y LEP (panel inferior) e imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (panel superior). Todos los datos se expresan como media \pm SEM.

Estos resultados son iguales a los detectados en el estudio de prevención de la hiperactividad con una línea de base de 28 días, expuestos en el anterior capítulo. Por otro lado, con respecto a los animales mantenidos a una temperatura ambiente de 25°C durante todo el experimento, a pesar de que el grupo tratado con leptina presenta mayores niveles de UCP1, estos no alcanzan la significación, $t(9) = -1.725$; $p = 0.119$ (Figura 23B). Por último, en los animales con

alimentación ad libitum, los niveles proteicos de UCP1 en BAT están más elevados en las ratas tratadas con leptina, $t(13) = -2.285$; $p = 0.040$, tal y como se puede observar en la Figura 23C. En resumen, los niveles de UCP1 en los animales tratados con leptina generalmente se muestran significativamente elevados, mientras que en los animales expuestos a una temperatura ambiente de 32°C se presentan disminuidos.

3.3. EFECTO DE LA DOSIS DE LEPTINA SOBRE LA ACTIVIDAD

Los resultados obtenidos en los anteriores estudios indicaron efectos opuestos de la leptina sobre la actividad de los animales en función de si estos son sometidos a restricción de comida o si son alimentados ad libitum. Así, cuando los animales reciben el tratamiento, si son sometidos a restricción de alimento, ya sea a una temperatura ambiente de 21°C o de 25°C (Estudio 1 y 2), la leptina produce una reducción de la proporción de actividad diurna con respecto a la actividad total diaria, aunque no se detectó ningún efecto sobre la actividad media diaria. Por otro lado, cuando los animales son alimentados ad libitum (Estudio 3), la leptina incrementa esta proporción de actividad diurna que además se ve reflejada en un aumento de la actividad media diaria. Además, la leptina mostró un efecto inhibitorio de la ingesta, tanto en animales a restricción de alimento como alimentados ad libitum, que en ninguno de los casos afectó al peso o a la ganancia de peso corporal.

Como hemos planteado en la introducción de este capítulo, es probable que la dosis de leptina utilizada hasta ahora, 1.29 mg/ml⁻¹, no fuese suficiente para desencadenar los efectos esperados sobre la hiperactividad entendida como la media diaria de actividad. Por lo tanto, se decidió estudiar el efecto de una dosis más alta de leptina, 2 mg/ml⁻¹, tanto en ratas a restricción de alimento, enmarcado en el Estudio 1, como en ratas con alimentación ad libitum, enmarcado en el Estudio 3. Por motivos de simplicidad los datos relativos a los animales con una dosis más elevada expuestos al procedimiento SIH, es decir, a restricción de alimento, solo serán comparados con el grupo que recibió la dosis estándar y el vehículo.

Como ya especificamos anteriormente, la primera fase del procedimiento SIH (fase AL) y la primera fase del estudio con alimentación ad libitum (fase pretratamiento) son idénticas, y como ya se especificó en la Figura 10, no se detectaron diferencias significativas entre ambos estudios en ninguna de las variables estudiadas.

A continuación, presentaremos en primer lugar los resultados relativos a la primera fase de ambos estudios teniendo en cuenta la asignación futura del tratamiento, es decir, vehículo, dosis estándar o dosis elevada. En segundo lugar, se presentarán los resultados de la segunda fase del procedimiento, cuando ya reciben los diferentes tratamientos y en el que a tres grupos de animales se les restringió la cantidad de comida, mientras que otros tres continuaron con la alimentación ad libitum. Por último, presentaremos los resultados relativos al ciclo circadiano de la actividad y la temperatura corporal.

Cómo se puede observar en las Figuras 24 y 26, no se han detectado diferencias significativas en la mayoría de las variables durante la primera fase de ambos estudios. A pesar de dividir los grupos teniendo en cuenta el peso corporal y el nivel de actividad en la rueda, en el caso del Estudio 1 en el que los animales fueron expuestos al procedimiento SIH, se detectó una menor ingesta por parte del grupo tratado con una dosis más elevada de leptina comparado con el grupo tratado con vehículo, $p = 0.046$, que sin embargo no tuvo repercusión sobre el peso corporal o la ganancia de peso, $F(2, 21) = 2.560$; $p = 0.101$ y $F(2, 21) = 0.622$; $p = 0.547$,

respectivamente. La media y SEM de la ingesta media diaria para estos animales son representadas a continuación: VH, 22.37 ± 0.52 g/día, 1.29LEP, 21.51 ± 0.52 g/día, y 2.00LEP, 20.46 ± 0.46 g/día. También, como ya hemos visto, la temperatura corporal de las ratas tratadas con vehículo es mayor que la de las ratas tratadas con leptina (Figura 12C y Figura 24). El ANOVA de medidas repetidas realizado en este caso para los grupos tratados con las diferentes dosis de leptina y con vehículo, también mostró un efecto principal significativo, $F(2, 21) = 6.297$; $p = 0.007$, el cual reveló que la temperatura corporal del grupo con una dosis de leptina más alta se asemeja más a la del grupo tratado con vehículo, $p = 0.774$, que a la del grupo tratado con 1.29 mg/ml^{-1} de leptina, $p = 0.022$ (Figura 24C). Por otro lado, en la Tabla 22, se pueden observar los valores de F y p de los ANOVAS realizados para analizar la actividad en la rueda, el peso corporal, la ganancia de peso corporal, la temperatura corporal y la ingesta de los animales del Estudio 3 durante la fase pretratamiento, que como ya hemos comentado, no mostraron diferencias significativas entre los grupos.

	Efecto principal
Actividad (revoluciones)	$F(2, 21) = 0.252$; $p = 0.785$
Peso corporal (g)	$F(2, 21) = 0.197$; $p = 0.822$
Temperatura corporal (°C)	$F(2, 17) = 2.262$; $p = 0.135$
Ganancia de peso (g)	$F(2, 21) = 0.437$; $p = 0.651$
Ingesta (g)	$F(2, 21) = 0.150$; $p = 0.861$

Tabla 22. Valores de F, grados de libertad y significación para el efecto principal de los ANOVA de medidas repetidas y del ANOVA de una vía durante la fase pretratamiento de ratas sometidas al procedimiento ad libitum. El ANOVA de medidas repetidas se realizó para las variables de actividad en la rueda, peso corporal, temperatura corporal e ingesta y el ANOVA de una vía se realizó para la variable ganancia de peso corporal.

Durante la segunda fase del Estudio 1, es decir, durante la fase RA, nuevamente el inicio de la restricción de alimento produce un aumento de la actividad en la rueda, $F(2.4, 53.8) = 25.345$; $p < 0.0001$, en todos los grupos, $F(2, 21) = 0.117$; $p = 0.890$, por lo que el aumento de dosis tampoco nos permitió detectar el efecto inhibitorio de la leptina (Figura 24A). Un ANOVA de medidas repetidas realizado para el peso corporal, reveló un efecto principal significativo, $F(2, 21) = 3.667$; $p = 0.043$, que indicó que las ratas tratadas con 2 mg/ml^{-1} de leptina mostraron una pérdida de peso menos pronunciada que los otros grupos, aunque el análisis post-hoc no detectó diferencias significativas con el grupo tratado con vehículo, $p = 0.090$, o con el grupo tratado con la dosis estándar de leptina, $p = 0.058$. A pesar de esta tendencia a mantener un mayor peso corporal, no se tradujo en una menor pérdida de peso, $F(2, 21) = 1.119$; $p = 0.345$ (Figura 25). Con respecto a la temperatura corporal, representada en la Figura 14C, si bien las ratas tratadas con la dosis elevada de leptina también sufren una disminución de la temperatura corporal una vez que son sometidas a restricción de alimento, $F(2.4, 50.8) = 22.144$; $p < 0.0001$, estas mantienen una temperatura corporal más elevada que las ratas tratadas con vehículo o tratadas con la dosis estándar de leptina (ambas $p < 0.05$). Por último, como el grupo con una dosis elevada de leptina se encuadra dentro del Estudio 1, también se midió la ingesta de los animales durante los primeros 90 minutos después de recibir la ración de comida. Al igual que ocurrió con la dosis estándar de leptina, cuando se realizó el ANOVA de medidas repetidas para toda la semana de restricción, no se detectaron diferencias significativas con respecto al grupo vehículo, $p = 0.08$, pero cuando el análisis se restringió a los cinco primeros días (del Día 0 al Día 4), la ingesta de las ratas tratadas con la dosis de 2 mg/ml^{-1} fue significativamente menor que la de las ratas tratadas con vehículo, $p = 0.010$. Pero, por el contrario, no se detectaron diferencias significativas entre las dos dosis de leptina, $p = 0.890$. De hecho, al final de la fase

RA, las ratas tratadas con leptina comieron 5 gramos menos que las ratas tratadas con vehículo, tal y como muestran la media y SEM para la ingesta acumulada durante esta hora y media a lo largo de toda la semana de restricción para los tres grupos que son representadas a continuación: VH, 41.23 ± 2.23 g, 1.29LEP, $34,74 \pm 1.11$ g y 2.00LEP, 35.85 ± 1.59 g.

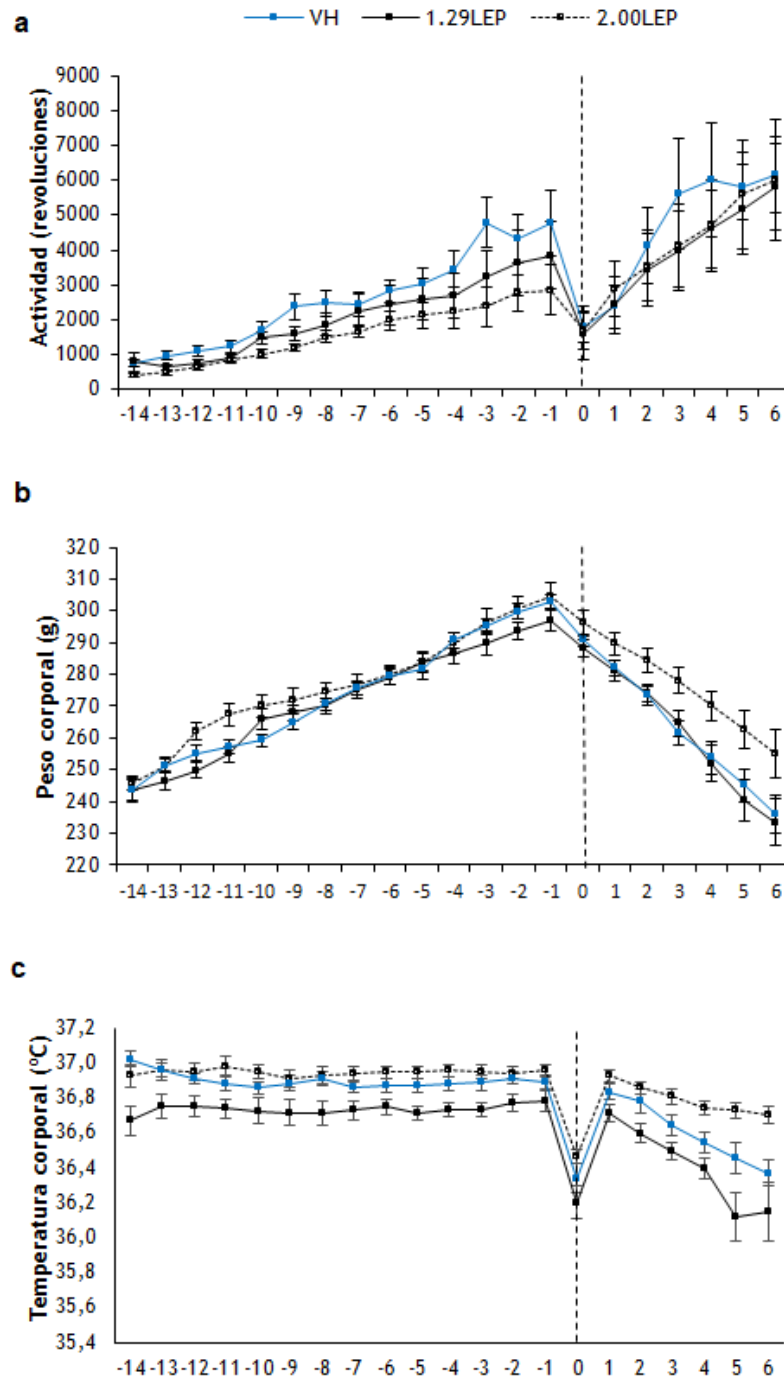


Figura 24. Actividad diaria en la rueda (A), peso corporal (B) y temperatura corporal (C) durante la fase ad libitum (Día -14 a Día -1) y durante la fase de restricción de alimento (Día 0 a Día 6). La línea vertical punteada separa las dos fases del experimento. Todos los datos se expresan como media \pm SEM.

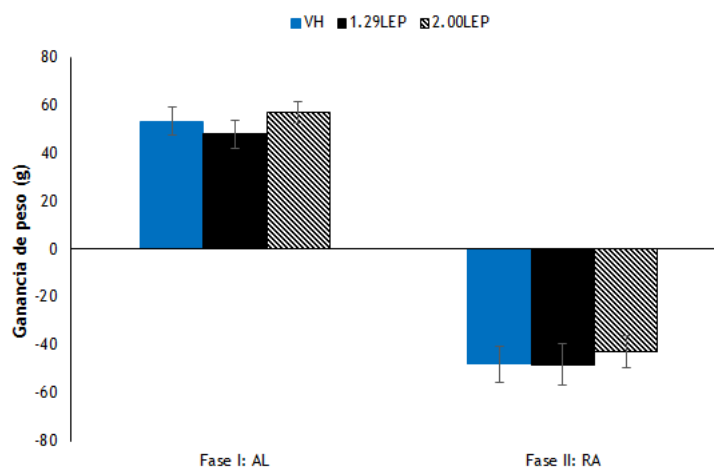


Figura 25. Ganancia de peso corporal acumulada durante la primera fase ad libitum (AL) y durante la fase de restricción de alimento (RA) pertenecientes al Estudio 1. Los datos se expresan como media \pm SEM.

Durante la fase de tratamiento del Estudio 3, en el que los animales continúan con la alimentación ad libitum, la actividad en la rueda mostrada por las ratas tratadas con una dosis más elevada de leptina también superó el nivel de actividad de la línea base, como ocurrió en las ratas tratadas con la dosis de 1.29 mg/ml^{-1} de leptina. Pero, aunque no se detectaron diferencias significativas entre las dos dosis y el grupo tratado con vehículo a lo largo de toda la semana, $F(2, 21) = 0.327$; $p = 0.724$, sí se detectó una diferencia significativa entre la actividad desarrollada el último día de la fase pretratamiento y el último día de la fase tratamiento, $t(8) = -2.669$; $p = 0.028$, que la dosis estándar no alcanzó (Tabla 23). En cuanto a la ingesta, la nueva dosis de leptina también produjo que estas ratas comiesen menos, $F(2, 21) = 5.666$; $p = 0.011$, pero no se detectaron diferencias significativas en esta menor ingesta con respecto a la dosis estándar (Figura 27A), $p = 0.946$. Nuevamente, esta reducción en la ingesta no tuvo repercusión sobre el peso corporal, $F(2, 21) = 0.184$; $p = 0.833$, o sobre la ganancia de peso corporal, $F(2, 21) = 0.850$; $p = 0.442$, tal y como se puede observar en la Figura 26B y 27B, respectivamente. Por último, tampoco se detectaron diferencias significativas en la temperatura corporal en función del tratamiento, $F(2, 17) = 0.712$; $p = 0.504$.

	Día -1	Día 6	t
VH	4463.29	3527.29	$t(7) = -1.520$; $p = 0.172$
LEP1.29	4132.63	5301.25	$t(6) = 0.468$; $p = 0.656$
LEP2.00	3771.56	5741.11	$t(8) = -2.669$; $p = 0.028$

Tabla 23. Media de actividad en el último día de la fase pretratamiento (Día -1) y en el último día de la fase de tratamiento (Día 6) para las ratas tratadas con vehículo (VH) y las tratadas con leptina (LEP1.29 y LEP2.00). Prueba t para muestras relacionadas.

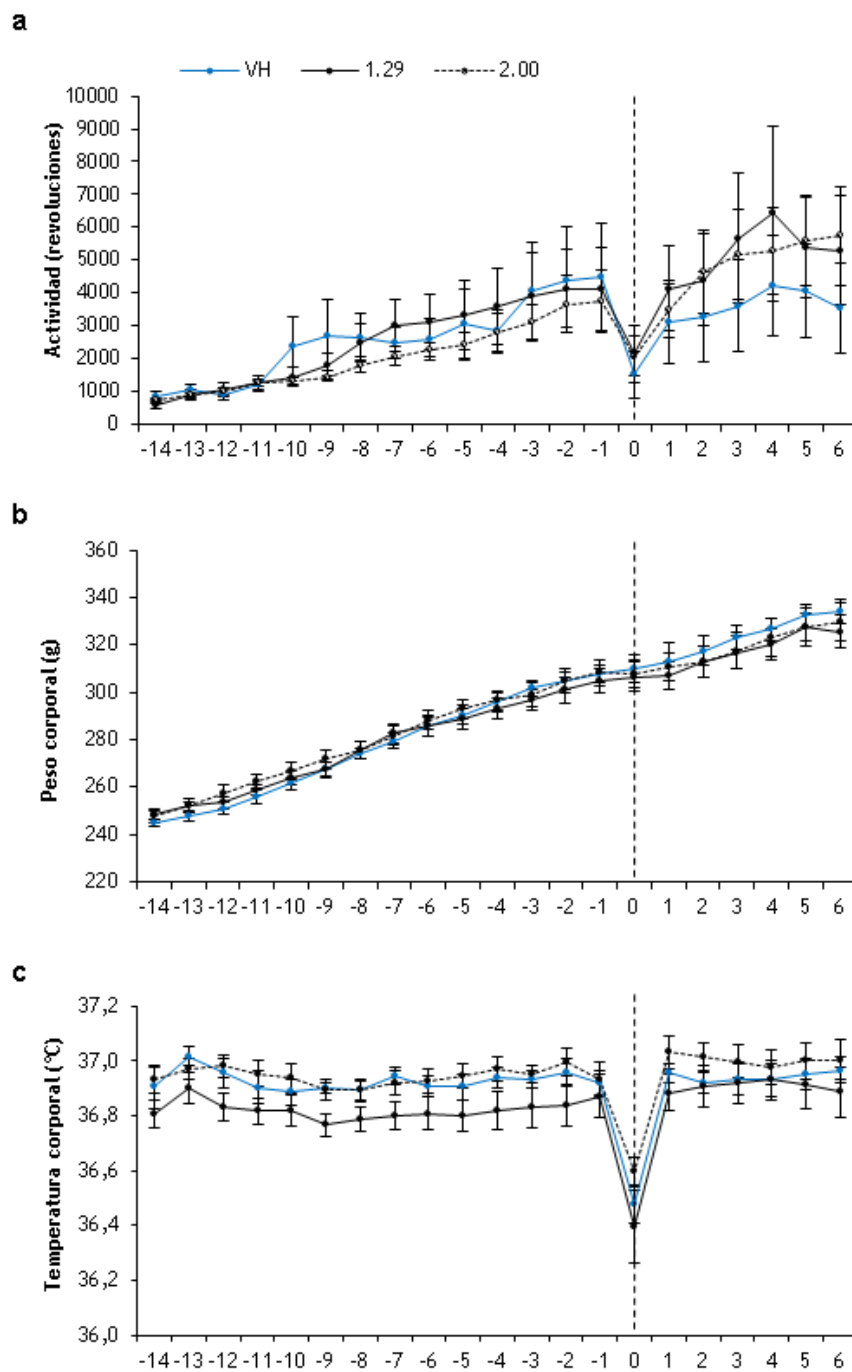


Figura 26. Actividad diaria en la rueda (A), peso corporal (B) y temperatura corporal (C) durante la fase pretratamiento (Día -14 a Día -1) y durante la fase de tratamiento (Día 0 a Día 6). La línea vertical punteada separa las dos fases del experimento. Todos los datos se expresan como media \pm SEM.

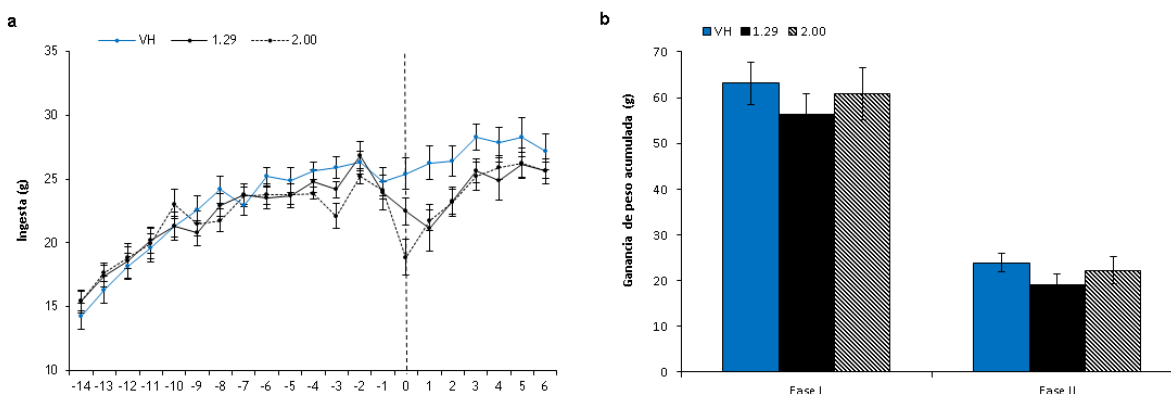


Figura 27. Ingesta (A) y ganancia de peso acumulada (B) durante la fase pretratamiento (Día -14 a Día -1) y durante la fase de tratamiento (Día 0 a Día 6). La línea vertical punteada separa las dos fases del experimento. Todos los datos se expresan como media \pm SEM

3.3.1. Ciclo circadiano de la actividad y la temperatura corporal

En la Figura 28 se ha representado la actividad en la rueda y la temperatura corporal en función de las horas de día y de noche durante la primera fase de cada uno de los estudios. Así, en el panel superior se presentan los datos relativos a los tres grupos del Estudio 1 (vehículo, dosis estándar de leptina y dosis elevada de leptina) durante la fase AL, y en el panel inferior para todos los grupos del Estudio 3 (vehículo, dosis estándar de leptina y dosis elevada de leptina) durante la fase pretratamiento. Como ya hemos comentado en varias ocasiones, estas fases son fases idénticas en las que los animales tienen acceso a rueda de actividad y a comida durante las 24 horas del día. Así, en ambos estudios los animales muestran una mayor actividad y una mayor temperatura corporal durante las horas de oscuridad, que fue más evidente a partir de la segunda semana de la primera fase de los procedimientos.

En la Figura 29 se representan la actividad en la rueda y la temperatura corporal en las horas de luz (panel superior) y en las horas de oscuridad (panel inferior), durante la segunda fase del Estudio 1, cuando comienza la restricción de alimento (fase RA). Mientras, en la Figura 30 se representan también la actividad y la temperatura corporal en las horas de luz (panel superior) y oscuridad (panel inferior), durante la fase tratamiento del Estudio 3, en la que continúan con alimentación ad libitum.

Con respecto al Estudio 1, anteriormente ya habíamos detectado un efecto inhibitor de la leptina con la dosis estándar sobre la proporción de actividad diurna durante la fase RA, que en los dos últimos días se revertía superando la proporción de actividad diurna de las ratas tratadas con vehículo. En el caso de las ratas tratadas con la nueva dosis de leptina, más alta, se observó el mismo efecto y además fue más pronunciado que con la dosis estándar. Así, el tratamiento con 2 mg/ml^{-1} de leptina consigue reducir la proporción de actividad diurna con respecto al grupo tratado con vehículo y el grupo tratado con la dosis estándar de leptina, incluso durante los dos últimos días de la semana de restricción en los que el efecto se revierte para la dosis estándar (Tabla 24). Por otro lado, al igual que con la dosis de 1.29 mg/ml^{-1} , con la nueva dosis también se detectó una disminución de la actividad media diurna en las horas de luz, representada en el panel superior de la Figura 29, durante los cuatro primeros días de la fase RA (todas las $p < 0.05$), aunque no se detectaron diferencias significativas entre ambas dosis.

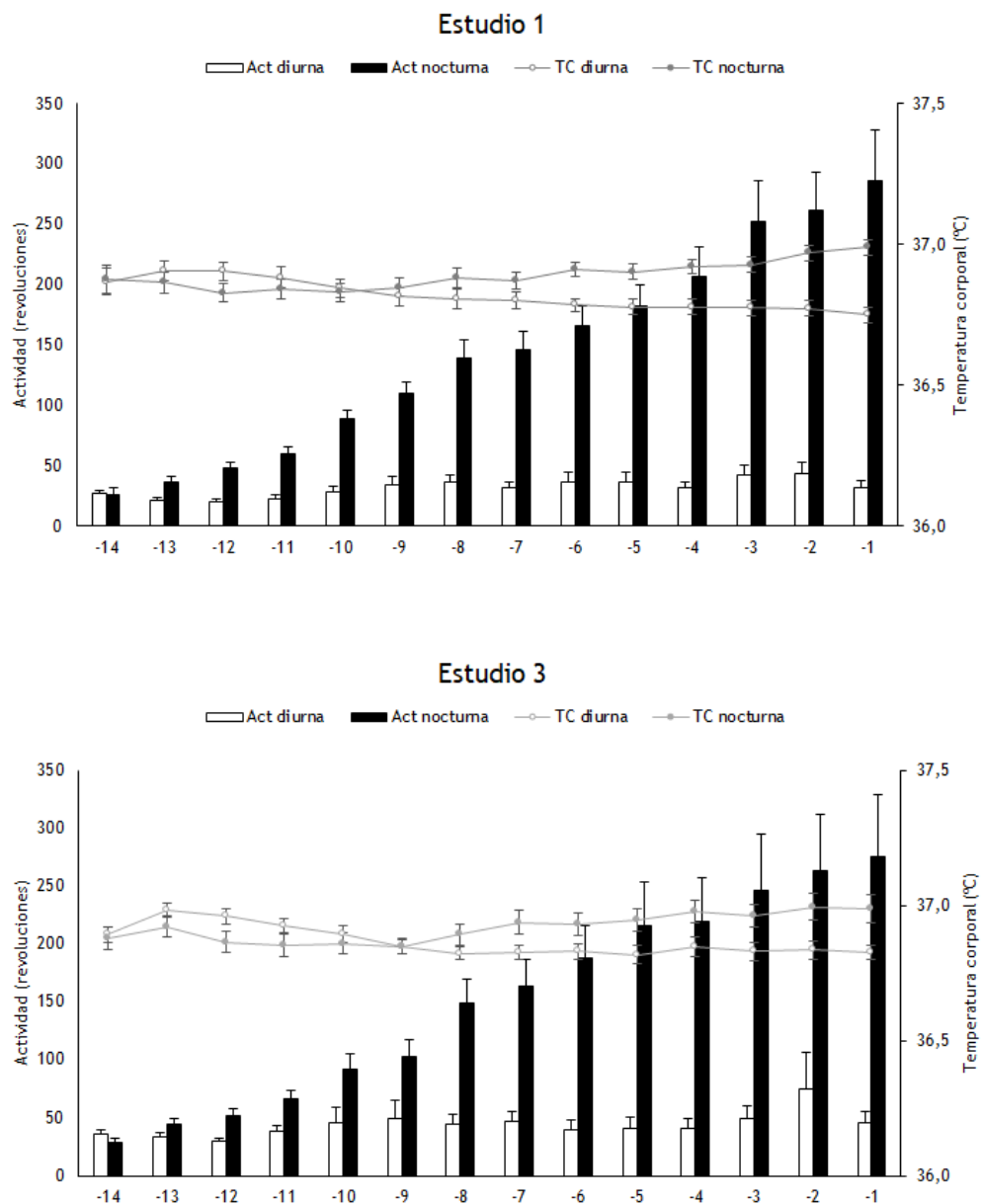


Figura 28. Actividad media diaria y temperatura corporal durante la fase de luz y la fase de oscuridad para el Estudios 1 (panel superior) y el Estudio 3 (panel inferior) en la primera fase de cada procedimiento en el que los animales tienen acceso a rueda de actividad y comida las 24 h. Todos los datos se expresan como media \pm SEM.

En cuanto a la temperatura corporal, se comentó que los animales del Estudio 1 presentaron un aumento de hasta dos décimas de grado durante la noche que con la nueva dosis de leptina alcanzó el medio grado centígrado. Además, la temperatura corporal de este nuevo grupo de leptina presentó valores más elevados en comparación con las ratas tratadas con una dosis más baja de leptina tanto en la fase de luz como en la fase de oscuridad (ambas $p < 0.01$), mientras que en comparación con el grupo tratado con vehículo únicamente en la fase de oscuridad, $p = 0.002$

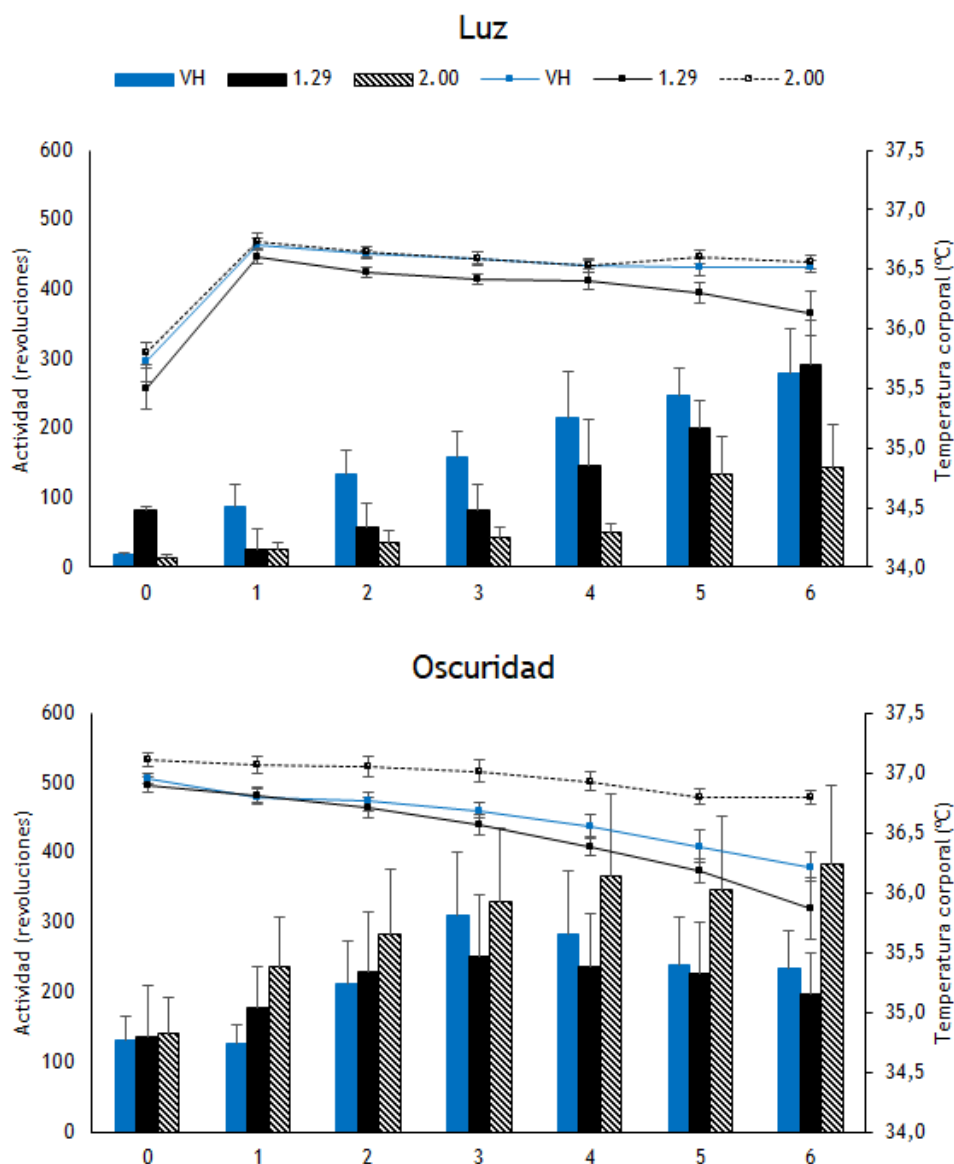


Figura 29. Actividad media diaria y temperatura corporal durante la fase de luz (panel superior) y durante la fase de oscuridad (panel inferior) en la fase de restricción de alimento (RA) para los grupos del Estudio 1: vehículo, dosis estándar y dosis 2 mg/ml⁻¹. Todos los datos se expresan como media ± SEM.

	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
VH	---	41.0% ^{a,b}	38.7% ^{a,b}	33.9% ^{a,b}	43.1% ^{a,b}	50.8% ^{a,b}	54.5% ^b
LEP estándar	---	12.5%	20.5% ^c	24.6% ^c	38.4% ^c	47.0% ^c	59.5% ^{a,c}
LEP 2 mg/ml ⁻¹	---	10.0%	11.3%	11.7%	12.3%	27.8%	27.3%

Tabla 24. Porcentaje de la ratio de actividad diaria durante la fase de luz/actividad diaria total - L/(L+O)- durante la fase de restricción (RA) para los grupos experimentales del Estudio 1: vehículo, dosis estándar y dosis 2 mg/ml⁻¹. Los datos de actividad para el Día 0 fueron excluidos del análisis debido a la atenuación de la actividad por la implantación de la minibombas osmóticas. Abreviaturas: ^a. Diferencias significativas entre VH y 1.29LEP. ^b. Diferencias significativas entre VH y 2.00LEP. ^c. Diferencias significativas entre 1.29LEP y 2.00LEP. Test de Chi cuadrado, todas las significaciones p < 0.001.

Con respecto al Estudio 3, la leptina mostró un efecto incrementando la proporción de actividad diurna respecto a la actividad media total en ratas con alimentación ad libitum. El aumento de la dosis de leptina, si bien también produjo este efecto sobre la proporción de actividad diurna, no fue más marcado que con la dosis más baja, sino que hasta fue inferior durante tres días de la fase de tratamiento, tal y como se puede observar en la Tabla 25. De hecho, mientras la dosis estándar de leptina también aumentó la actividad media diaria durante las horas de luz con respecto a las ratas tratadas con vehículo, con la nueva dosis de leptina no se detectaron diferencias significativas ni durante el día, $F(2, 19) = 1.244$; $p = 0.311$, ni durante la noche, $F(2, 19) = 0.184$; $p = 0.834$ (Figura 30).

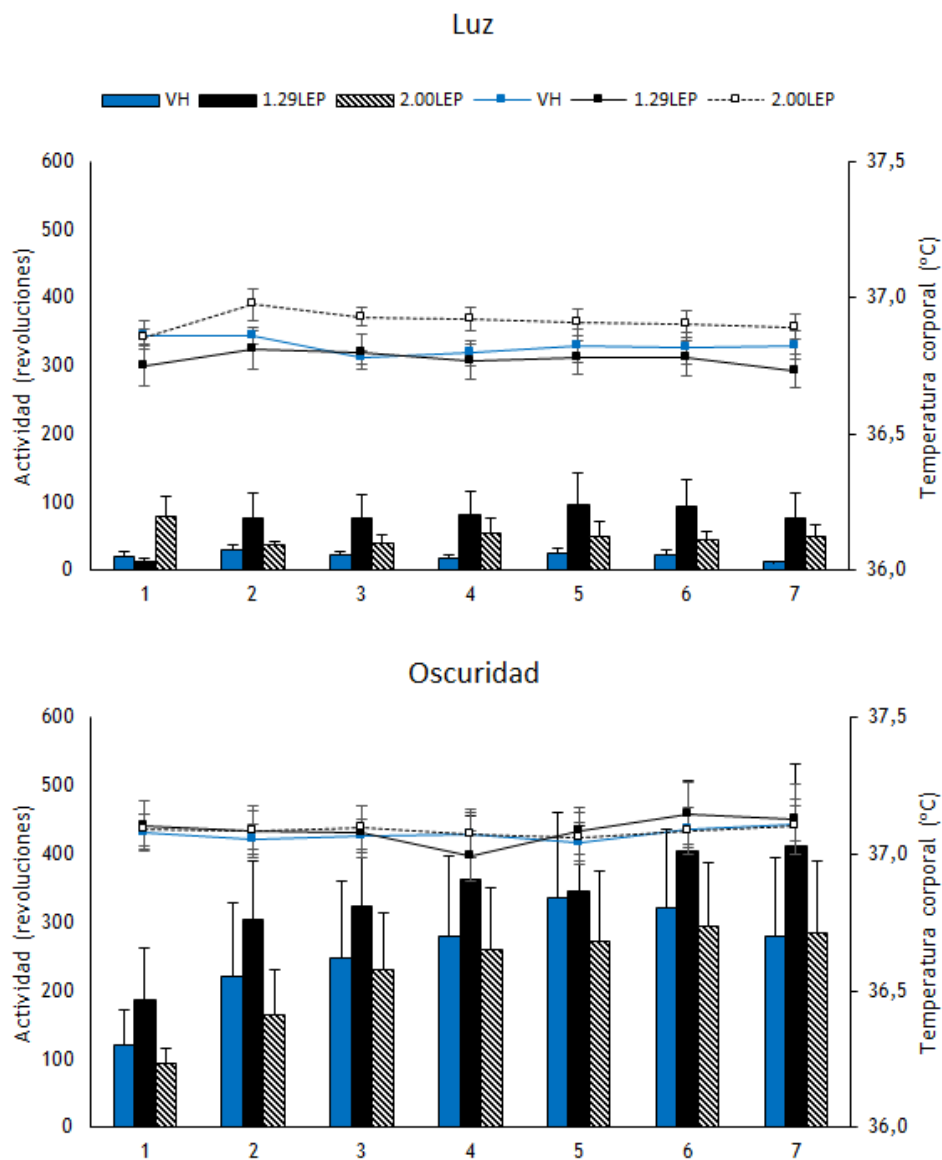


Figura 30. Actividad media diaria y temperatura corporal durante la fase de luz (panel superior) y durante la fase de oscuridad (panel inferior) en la fase de restricción de alimento (RA) para los grupos del Estudio 3: vehículo, dosis estándar y dosis 2 mg/ml⁻¹. Todos los datos se expresan como media \pm SEM.

Respecto a la temperatura corporal, aunque como hemos descrito anteriormente no se detectaron diferencias significativas en la media diaria, cuando tenemos en cuenta el ciclo circadiano, la dosis de 2 mg/ml⁻¹ tiende a producir un aumento de la temperatura corporal durante las horas de luz, $F(2, 17) = 3.038$; $p = 0.074$, que se debe especialmente a sus diferencias con el grupo tratado con la dosis estándar de leptina, $p = 0.061$. Por otro lado, tampoco se detectaron diferencias significativas en la temperatura corporal durante la noche en función del tratamiento recibido, $F(2, 17) = 0.026$; $p = 0.975$.

	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
VH	---	11.9%	8.2%	6.1%	6.8%	6.7%	4.2%
LEP estándar	---	20.5% ^a	19.0% ^{a,c}	18.4% ^a	21.2% ^{a,c}	18.9% ^{a,c}	15.5% ^a
LEP 2 mg/ml ⁻¹	---	18.7% ^b	14.4% ^b	17.1% ^b	15.6% ^b	13.2% ^b	14.7% ^b

Tabla 25. Porcentaje de la ratio de actividad diaria durante la fase de luz/actividad diaria total - L/(L+O)- durante la fase de tratamiento para los grupos experimentales del Estudio 3: vehículo, dosis estándar y dosis 2 mg/ml⁻¹. Los datos de actividad para el Día 0 fueron excluidos del análisis debido a la atenuación de la actividad por la implantación de la minibombas osmóticas. Abreviaturas: ^a. Diferencias significativas entre VH y 1.29LEP. ^b. Diferencias significativas entre VH y 2.00LEP. ^c. Diferencias significativas entre 1.29LEP y 2.00LEP. Test de Chi cuadrado, todas las significaciones $p < 0.001$.

En resumen, aunque el empleo de una dosis más alta de leptina en el procedimiento SIH, no produce un mayor efecto que la dosis estándar con respecto a la actividad media diaria y la ingesta de los animales, sí logró reducir aún más la proporción de actividad diurna con respecto a la actividad total diaria, evitando el efecto rebote que se vio con la dosis estándar durante los últimos días de la semana de restricción. Además, mientras la dosis de 1.29 mg/ml⁻¹ redujo la temperatura corporal de las ratas con respecto a las tratadas con vehículo, el aumento de la dosis de leptina tuvo el efecto contrario, presentando una temperatura corporal más alta que cualquiera de los demás grupos experimentales. Esto indica un efecto protector de la leptina más marcado cuando la dosis es de 2 mg/ml⁻¹, ya que además mostraron una tendencia a un mayor peso corporal, aunque la diferencia no fuese estadísticamente significativa ni tuviese repercusión sobre una menor pérdida de peso. Con respecto a los animales que fueron alimentados ad libitum cuando recibieron el tratamiento, el aumento de la dosis de leptina no produjo cambios más marcados con respecto a la dosis más baja en las distintas variables, a excepción de una tendencia a una mayor temperatura corporal durante las horas de luz.

3.4. EFECTO DE LA LEPTINA RECOMBINANTE DE RATÓN SOBRE LA ACTIVIDAD EN EL PROCEDIMIENTO SIH

Hasta ahora no logramos detectar el efecto inhibitorio de la leptina sobre la hiperactividad de los animales sometidos al procedimiento SIH, tanto con una línea de base completa de 28 días, como reduciendo la actividad basal excesiva que estas presentaban con la reducción de la fase AL en catorce días y con el aumento de la temperatura ambiente a 25°C, o aumentando la dosis a 2 mg/ml⁻¹ de leptina (casi el doble de la dosis estándar). A pesar de esto, en cada uno de los estudios detectamos una disminución de la proporción de actividad diurna respecto a la actividad total diaria por parte de la leptina que fue más patente con la dosis más alta. Así, la única duda de todas las descritas en la introducción de este capítulo que nos queda por despejar

con respecto a las posibles causas de la ausencia de efecto de la leptina en la prevención de la hiperactividad en este modelo animal, es la que hace referencia al origen de la leptina recombinante. Por lo tanto, con el objeto de describir el efecto de la leptina recombinada de ratón en la prevención de la hiperactividad en el procedimiento SIH, se realizó un cuarto y último estudio. Para ello, se comparó un nuevo grupo tratado con leptina procedente de ratón a la dosis estándar de 1.29 mg/ml^{-1} con un grupo que recibió el mismo volumen de vehículo.

A pesar de que los diferentes lotes de ratas se corresponden con la misma cepa Sprague-Dawley y fueron encargados al mismo proveedor de forma consecutiva y con las mismas características de peso y edad para todos los estudios, como se observa en la Figura 31, únicamente el comportamiento de las ratas de este cuarto estudio se diferencia de los anteriores en casi todas las variables estudiadas. Así, tal y como se extrae de la Tabla 26 que muestra los ANOVA realizados para los Estudios 1, 3 y 4, los animales de este último estudio presentaron una mayor actividad en la rueda y una mayor ingesta que se tradujo en una mayor ganancia de peso corporal. Por otro lado, aunque la temperatura corporal también fue más alta, solo se detectaron diferencias significativas con respecto al Estudio 1, $p = 0.004$.

	Efecto principal
Actividad (revoluciones)	F (1, 74) = 7.060; p = 0.002
Peso corporal (g)	F (1, 74) = 28.884; p < 0.0001
Ganancia de peso (g)	F (1, 74) = 36.861; p < 0.0001
Temperatura corporal (°C)	F (1, 67) = 4.522; p = 0.014
Ingesta (g)	F (1, 74) = 43.826; p < 0.0001

Tabla 26. Valores de F y p para el efecto principal de los ANOVA de medidas repetidas y valor de F y p del ANOVA de una vía realizados para los Estudios 1, 3 y 4. El ANOVA de medidas repetidas se realizó para las variables de actividad en la rueda, peso corporal, temperatura corporal e ingesta y el ANOVA de una vía se realizó para la variable ganancia de peso corporal.

A continuación, se presentarán en primer lugar los datos obtenidos en la Fase AL y seguidamente los de la Fase RA. También se presentarán datos relativos al ritmo circadiano de la actividad en la rueda y la temperatura corporal.

Como ya hemos comentado, a pesar de las diferencias detectadas con respecto a los Estudios 1 y 3 durante la primera fase de los procedimientos, nos encontramos con que la evolución de las diferentes variables es exactamente la misma en este estudio. Así, la actividad en la rueda, el peso corporal y la ingesta aumentan con el paso de los días, al igual que ocurrió en los estudios anteriormente descritos (Figura 32). Por otro lado, tampoco se detectaron diferencias significativas en la actividad, el peso corporal, la ganancia de peso o la ingesta durante esta fase AL, teniendo en cuenta la futura asignación al tratamiento, leptina o vehículo, tal y como se muestra en la Tabla 27.

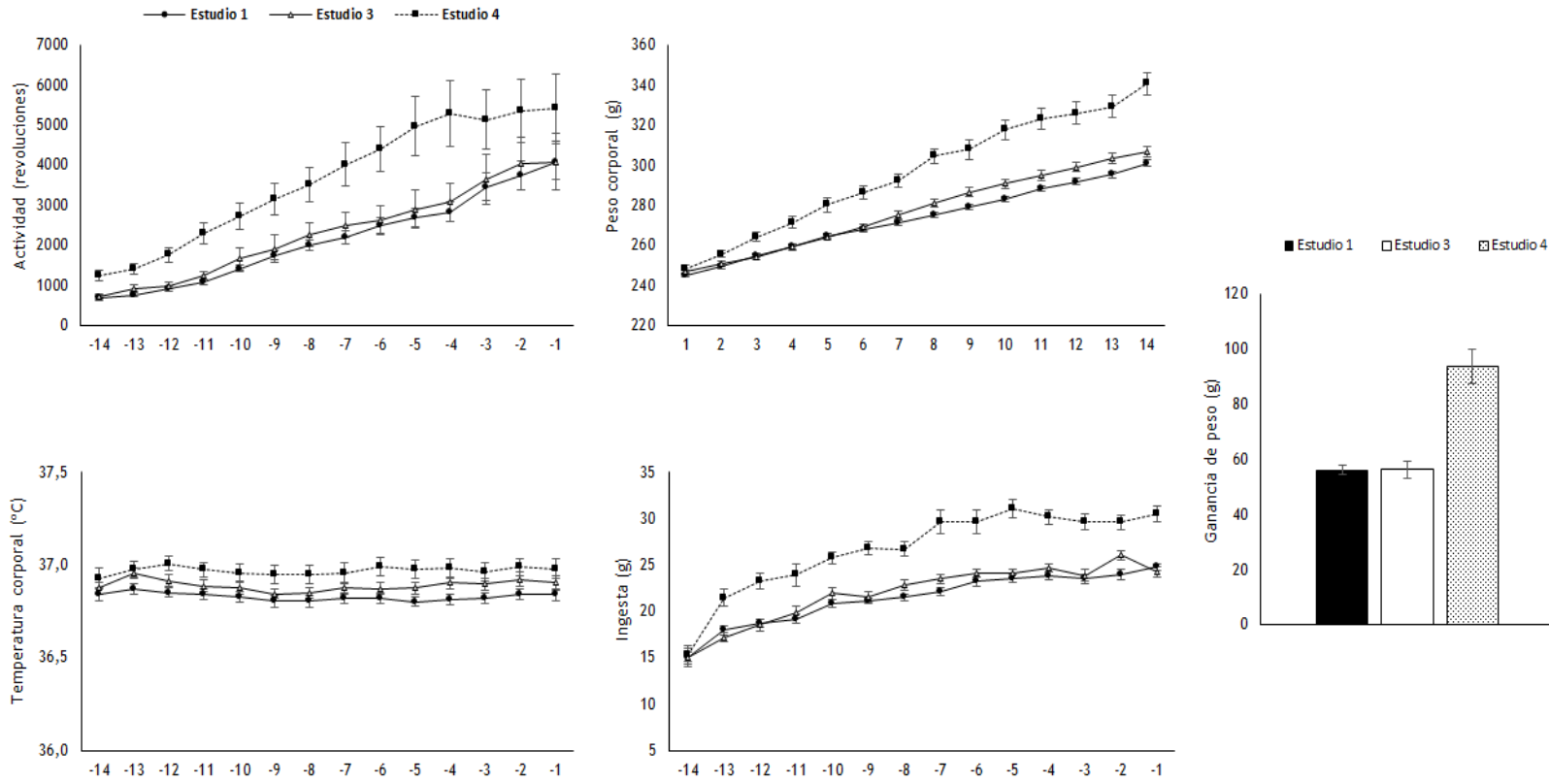


Figura 31. Actividad diaria en la rueda, peso corporal, temperatura corporal, ingesta y ganancia de peso corporal durante la fase AL (Día -14 a Día 1) para los Estudios 1, 3 y 4. Todos los datos se expresan como media \pm SEM.

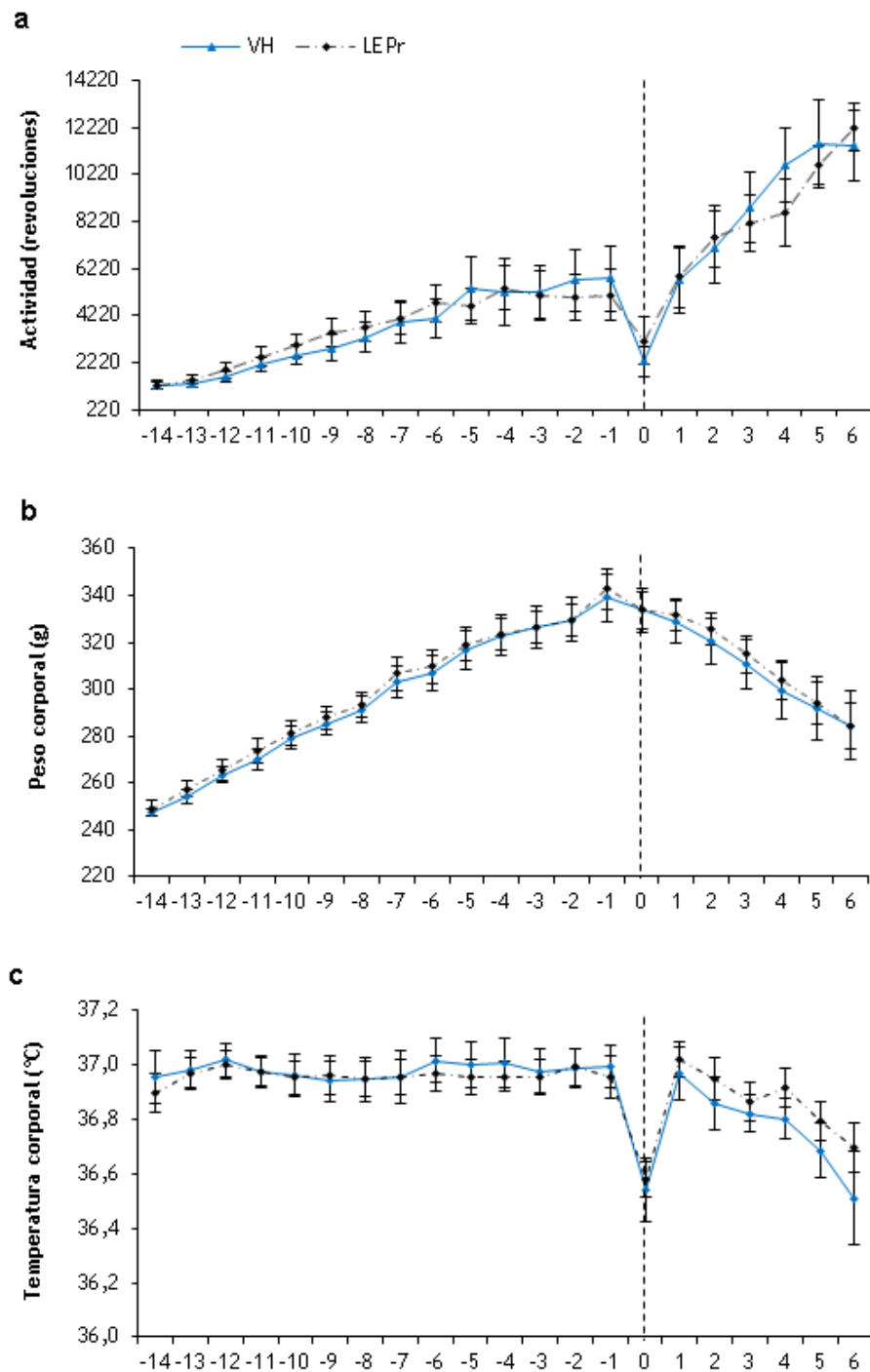


Figura 32. Actividad diaria en la rueda (A), peso corporal (B) y temperatura corporal (C) durante la fase ad libitum (Día -14 a Día -1) y durante la fase de restricción (Día 0 a Día 6). La línea vertical punteada separa las dos fases del experimento. Todos los datos se expresan como media \pm SEM

Efecto principal	
Actividad (revoluciones)	F (1, 14) = 0.005; p = 0.944
Peso corporal (g)	F (1, 14) = 0.070; p = 0.796
Temperatura corporal (°C)	F (1, 12) = 0.041; p = 0.842
Ganancia de peso (g)	t (14) = -0.146; p = 0.886
Ingesta (g)	F (1, 14) = 1.039; p = 0.325

Tabla 27. Valores de F y p para el efecto principal de los ANOVA de medidas repetidas y valor de F y p del ANOVA de una vía realizados para la fase AL. El ANOVA de medidas repetidas se realizó para las variables de actividad en la rueda, peso corporal, temperatura corporal e ingesta y el ANOVA de una vía se realizó para la variable ganancia de peso corporal.

Durante la fase RA, al igual que ocurrió en los Estudios 1 y 2, al iniciar la restricción de alimento las ratas continuaron aumentando la carrera, $F(3.1, 43.7) = 40.633$; $p < 0.0001$, independientemente del tratamiento recibido, $F(1, 14) = 0.014$; $p = 0.909$ (Figura 32A). Todos los animales perdieron peso, con independencia del tratamiento recibido, $F(1, 14) = 0.036$; $p = 0.851$ (Figura 32B), por lo que tampoco se detectaron diferencias en la ganancia de peso, $t(14) = 0.007$; $p = 0.994$ (Figura 33). Por último, aunque la temperatura corporal de los animales tratados con leptina de ratón parece más elevada que la de los animales tratados con vehículo, no se detectaron diferencias significativas, $F(1, 12) = 1.170$; $p = 0.301$ (Figura 32C).

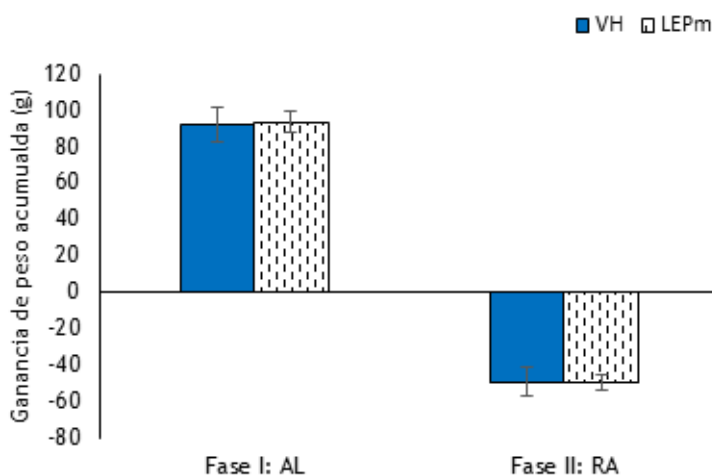


Figura 33. Ganancia de peso acumulada durante la fase ad libitum (Día -14 a Día -1) y durante la fase de restricción (Día 0 a Día 6). Todos los datos se expresan como media \pm SEM

3.4.1. Ciclo circadiano de la actividad y la temperatura corporal

Durante la fase AL, como se puede observar en la Figura 34, los animales del Estudio 4 también mostraron mayor actividad y temperatura corporal durante las horas de oscuridad. Además, la diferencia entre la temperatura corporal en las horas de luz y las horas de noche se hace más evidente a medida que aumenta la actividad en la rueda.

A pesar de la restricción de alimento, los animales mostraron una mayor actividad y temperatura corporal durante la fase RA, tal y como ocurrió en los animales del estudio de prevención de la hiperactividad con una línea de base de 28 días, descrito en el anterior capítulo. En todos los estudios realizados hasta el momento, los animales tratados con leptina de rata

mostraron una disminución en la proporción de actividad diurna, cuya duración variaba en función de si fueron mantenidos a una temperatura ambiente de 21°C, 25°C, o la dosis empleada. Nuevamente, con la leptina de ratón observamos este efecto, pero con menor intensidad ya que no aparece hasta el Día 3 de la semana de restricción, e incluso en los primeros días estos animales mostraron una mayor proporción de actividad diurna que las ratas tratadas con vehículo (Tabla 28).

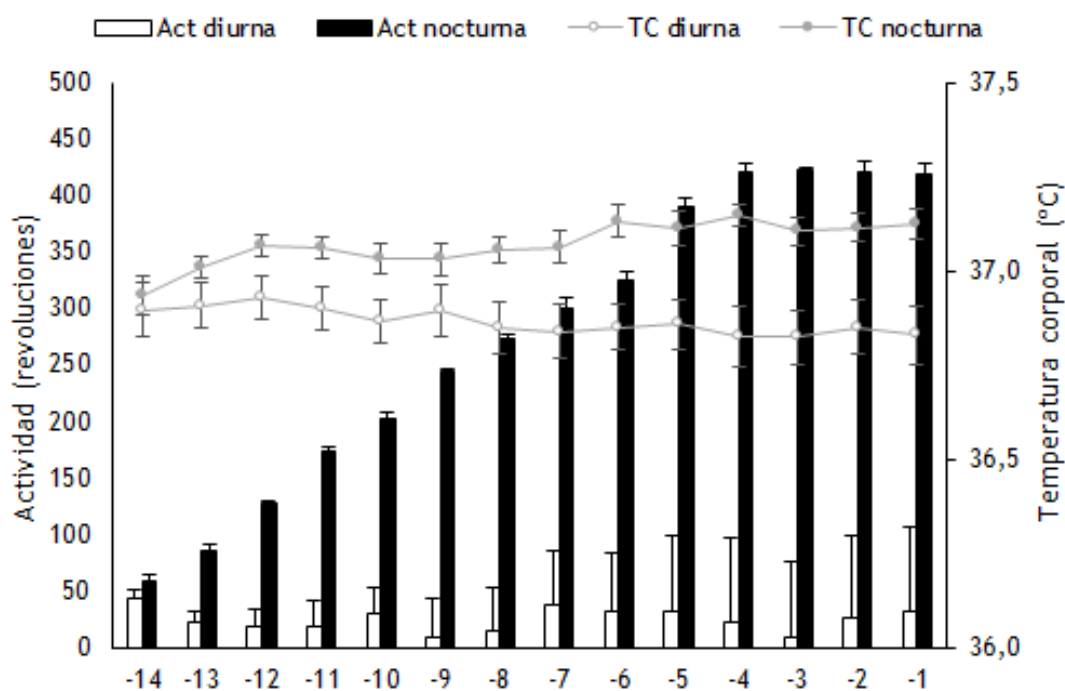


Figura 34. Actividad media diaria y temperatura corporal durante la fase de luz y la fase de oscuridad para los grupos experimentales del Estudio 4, vehículo vs leptina de ratón, en la fase ad libitum (AL). Todos los datos se expresan como media \pm SEM

	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
VHr	---	3.2%	2.2%	4.2% ^a	7.9% ^a	17.6% ^a	19.1% ^a
LEPr	---	8.0% ^a	4.3%	3.3%	4.6%	4.0%	13.1%

Tabla 28. Porcentaje de la ratio de actividad diaria durante la fase de luz/actividad diaria total - L/(L+O)- durante la fase de restricción (RA). Los datos de actividad para el Día 0 fueron excluidos del análisis debido a la atenuación de la actividad por la implantación de la minibombas osmóticas. Abreviaturas: ^a. Diferencias significativas entre VHr and LEPr. Test de Chi cuadrado, todas las significaciones $p < 0.001$.

Por otro lado, no se han detectado diferencias significativas en la actividad en la rueda y en la temperatura corporal entre el grupo tratado con leptina de ratón y el grupo tratado con vehículo, tanto en las horas de día como en las horas de oscuridad, tal y como se puede observar en la Figura 35.

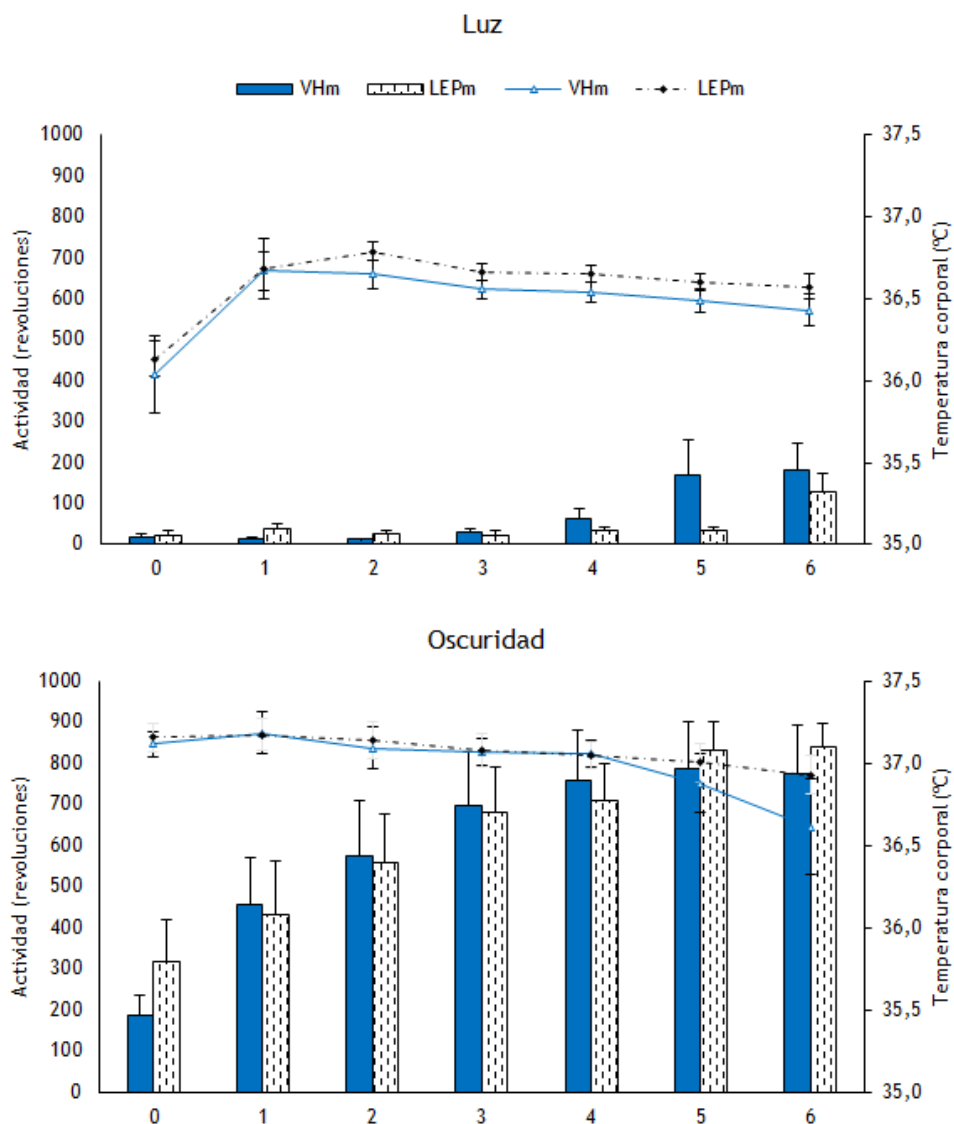


Figura 35. Actividad media diaria y temperatura corporal durante la fase de luz (panel superior) y durante la fase de oscuridad (panel inferior) en la fase de restricción de alimento (RA) para los grupos del Estudio 4, vehículo vs leptina de ratón. Todos los datos se expresan como media \pm SEM.

4. DISCUSIÓN

En este capítulo tratamos de despejar algunas dudas con respecto a las posibles circunstancias que podrían estar causando la falta de efecto por parte de la leptina en la prevención de la hiperactividad en el procedimiento SIH: una actividad basal excesiva, un mal funcionamiento de las minibombas osmóticas o de la leptina misma, que la dosis empleada no fuese suficiente o el origen de la leptina recombinada.

Con respecto a una actividad basal excesiva, se especuló que las diferencias de actividad en la fase AL entre el estudio de Exner y el estudio de prevención de la hiperactividad realizado en el anterior capítulo, podría estar enmascarando el efecto de la leptina sobre la reducción de

la hiperactividad. Descartada la idea de que estas diferencias en la actividad se deban a la cepa de la rata (Bauer, 1990), se optó por reducir el tiempo que los animales están sometidos a la rueda de actividad en condiciones de alimentación ad libitum a 14 días. A pesar de que este acortamiento de la línea de base AL, lo cual redujo en 2975 revoluciones la media de actividad en el último día de la fase ad libitum con respecto a la media de actividad para el mismo día en el estudio realizado con 28 días de línea base¹⁴, las ratas en nuestros estudios aun mostraron un nivel de actividad superior en un 50% a la tasa de actividad del estudio de Exner et al. (2000). Esta diferencia parece estar relacionada con la influencia de la temperatura ambiente como responsable de los bajos niveles de actividad de los animales del estudio original, pues se trata de una variable relevante a la hora de modular la actividad (Gutiérrez, 2002). En consecuencia, se llevó a cabo un nuevo estudio en el que las dos fases del procedimiento se realizaron a una temperatura de 25°C. Finalmente, estas ratas mantenidas a 25°C y con una línea de base acortada, desarrollaron una actividad media de 1300 revoluciones en el último día de la fase ad libitum, por lo que se asemeja más a la actividad de las ratas del estudio original. A parte de las diferencias en la magnitud de la actividad desarrollada a lo largo de la fase AL, también se encontraron diferencias en el nivel de actividad de las ratas tratadas con vehículo durante la fase RA. En el estudio original, cuando las ratas eran sometidas a restricción de alimento y tratadas con vehículo, la actividad en el último día de la fase AL llegó a triplicar la actividad basal. En nuestros estudios, incluido el realizado con una línea de base de 28 días, la actividad en el último día de la fase RA de las ratas tratadas con vehículo, únicamente supuso 1.5 veces la actividad de línea de base, tanto en los animales alojados a 21°C como a 25°C. Por lo tanto, si bien logramos ajustar el nivel de actividad durante la fase AL, las ratas tratadas con vehículo de nuestros estudios presentaron unos niveles de hiperactividad durante la fase RA más bajos que los del estudio de Exner et al (2000). Por otro lado, si bien algún estudio logra la estabilización de la actividad en 10 días (Morse et al., 1995), otros estudios muestran de la necesidad de un mínimo de 21 días (Greenwood et al., 2011; Kanarek, D'Anci, Jurdak & Mathes, 2009; Mathes & Kanarek, 2006; Werme et al., 2002). Así nuestros resultados con respecto a la actividad de los animales durante la fase AL parecen situarse de acuerdo con estos últimos estudios, ya que tanto los animales alojados a 21°C como a 25°C, no alcanzan la estabilidad de la actividad a lo largo de los 14 días que dura la fase AL.

Sin embargo, a pesar de la baja tasa de actividad, de nuevo la leptina no volvió a mostrar un efecto reductor sobre la actividad media diaria en los animales alojados a 25°C, en la misma línea que había sucedido con los animales estudiados a 21°C, independientemente de la duración de la línea de base y de la estabilización o no de la actividad de los animales al final de esa fase AL.

Por el contrario, y al igual que ocurrió con los animales sometidos al procedimiento SIH con una línea de base de 28 días, el aumento de la temperatura ambiente a 32°C sí logró prevenir la hiperactividad y la hipotermia, aun cuando la actividad no había sido estabilizada previamente debido a la reducción de días de la fase AL. De hecho, las ratas a 32°C corrieron seis veces menos que las ratas mantenidas a 21°C, independientemente de si fueron tratadas con vehículo o leptina, o de la dosis de leptina empleada. Tanto en el estudio con una fase AL de 28 días como con la fase AL establecida en 14 días, la leptina no tuvo un efecto significativo sobre la actividad media diaria de los animales. Pero sí mostraron una reducción en la proporción de actividad diurna con respecto a la actividad media total, que fue más acentuada

¹⁴ Esta reducción en la actividad a lo largo de 14 días de línea de base con respecto a la actividad durante 28 días de línea de base fue estadísticamente significativa: $t(57) = 2.784$; $p = 0.007$. La media y SEM para cada grupo se detallan a continuación: 28AL, 7461.85 ± 903.59 revoluciones y 14AL, 4486.71 ± 511.84 revoluciones.

cuando las ratas fueron tratadas con la dosis elevada de leptina y menos pronunciada cuando los animales son mantenidos a 25°C durante todo el experimento, por lo que la temperatura ambiente podría estar influyendo en la respuesta de la leptina (Haltiner, Mitchell & Harris, 2004; Harris, Mitchell, Kelso & Flatt, 2007).

A pesar de que las ratas mantenidas a 21°C y con una línea de base más larga casi duplicaron la actividad de las ratas con una línea de base de 14 días, estas mostraron una mejor preservación del peso corporal, la temperatura corporal y una menor desregulación del ritmo circadiano de actividad durante la fase RA, independientemente del tratamiento. Este hecho podría estar relacionado con la cantidad de alimento recibido durante la fase RA que supone el 60% de los alimentos ingeridos durante la semana anterior, ya que en los animales cuya fase AL se extendió durante cuatro semanas, el mayor consumo de alimento al final de esta fase proporcionó a estos animales, en comparación con los animales con sólo dos semanas de comida ad libitum, cinco gramos diarios adicionales durante la fase RA. Esto se ve reforzado por los resultados obtenidos en el Estudio 4, en el que se describió el efecto de la leptina recombinada de ratón sobre la actividad en el procedimiento SIH, ya que tampoco mostraron una desregulación del ritmo circadiano. Como hemos descrito, estos animales a diferencias de los animales de los demás estudios realizados presentaron una mayor ingesta durante la fase AL, por lo que durante la fase RA les correspondió también una mayor cantidad de alimento.

Continuando con las diferentes causas detrás de la ausencia de efecto por parte de la leptina, se analizaron los niveles de leptina en sangre de los principales grupos mantenidos a 21°C (21VH y 21LEP) y de los animales expuestos a 32°C. Los resultados indicaron el correcto funcionamiento de las minibombas osmóticas pues los animales tratados con leptina presentaron los mayores valores. Por otro lado, las ratas calentadas a 32°C mostraron mayores niveles de leptina en sangre en relación con las ratas 21VH, probablemente debido a su mayor peso corporal (Considine et al., 1996; Schwartz, Peskind, Raskind, Boyko & Porte, 1996).

Una innovación de esta tesis doctoral incluye la monitorización de la ingesta de los animales durante los primeros noventa minutos después de presentarles la ración diaria de comida, lo cual permite comparar la ingesta con los animales sometidos al procedimiento ABA. Debido a que los animales tienen 24 horas para ingerir la cantidad de comida servida, la ingesta no suele ser una variable de interés en SIH ya que durante la fase RA, la reducción en la cantidad de comida hace que los animales consuman el total antes de recibir la siguiente ración, por lo que no es posible detectar el efecto inhibitorio que la leptina tiene sobre la ingesta (Baskin et al., 1999; Cheung, Clifton & Steiner, 1997; Cowley et al., 2001; Korner et al., 2001). Una ventaja en el primer estudio realizado en este capítulo fue revelar que la leptina también disminuye la ingesta en ratas SIH durante los primeros 90 minutos después de recibir su ración diaria de comida, muy similar a como se informó en ratas ABA con infusión de leptina (Hillebrand et al., 2005b). Es decir que la leptina parecía estar funcionando en el enlentecimiento de la ingesta, pero no tuvo ningún efecto preventivo sobre la actividad.

Por otro lado, el efecto de la leptina sobre la ingesta, el peso corporal y la actividad en la rueda en ratas con alimentación ad libitum se mostró en línea con los resultados publicados por Exner et al., (2000) con ratas alimentadas ad libitum y en otros estudios (Choi et al., 2008; Meek et al., 2012; Morton et al., 2011), ya que en ese estudio la leptina también mostró un efecto facilitador de la actividad, aunque en nuestro estudio no se tradujera en una mayor actividad con respecto a las ratas infundidas con vehículo durante la fase de tratamiento. Por el contrario, nuevamente encontramos que la leptina ejerce un efecto sobre la proporción de actividad diurna en ratas alimentadas ad libitum, incrementándola. De nuevo, en desacuerdo

con el estudio de Exner et al. (2000), las ratas tratadas con leptina y con alimentación ad libitum, en comparación con las ratas tratadas con vehículo, no produjo diferencias en la media diaria de peso corporal o en la ganancia de peso, a pesar de reducir la ingesta. Esta ausencia de efecto sobre el peso, pero sí la reducción de la ingesta, es frecuente encontrarla en otros estudios en los que los animales no son estudiados en ruedas de actividad (Duan, 2007; Scarpace et al., 1997; Scarpace et al., 1998; Scarpace & Matheny, 1999; Sirotkin et al., 2008; Yaspelkis, Ansari, Ramey, Holland & Loy, 2004). Tratando de encontrar una explicación a la divergencia de nuestros resultados con los publicados por Exner et al., (2000) una última posibilidad podría ser debido a las diferencias en el momento de dispensar la comida. Si bien en los estudios anteriormente citados no se especifica la hora a la que se suministra la comida, en nuestro estudio la ración diaria de comida se facilitaba a los animales tres horas después de comenzar el ciclo de luz, mientras que en el estudio original las raciones eran facilitadas al inicio de la fase de oscuridad.

Cómo ya hemos comentado, aparte de reducir la ingesta y el peso corporal, la leptina también ejerce su efecto sobre el gasto energético aumentando la termogénesis (Dodd et al., 2015; Pandit et al., 2017; Van Dijk, 2001), siendo el aumento de la proteína desacoplante 1 (UCP1), o termogenina, el principal indicador de un incremento en el gasto energético (Lowell & Spiegelman, 2000). Al igual que en el estudio de prevención de la hiperactividad con una línea base de 28 días, las ratas tratadas con leptina con una línea de base de 14 días mostraron un aumento de la termogénesis que se refleja en el aumento de la expresión proteica de UCP1 en el BAT, tanto en las ratas mantenidas a 21°C como en las ratas a 25°C. De nuevo este aumento de UCP1 en las ratas tratadas con leptina no se tradujo en un aumento de la temperatura corporal media diaria, lo cual podría ser debido, en el caso de las ratas a 25°C, a que se encuentran en una situación fisiológicamente cerca de la zona termoneutral (Wang et al., 1998). También detectamos de nuevo la reducción de UCP1 en las ratas calentadas a 32°C, dando más refuerzo a los datos mostrados con el procedimiento SIH con 28 días de línea base. En el caso de los animales alimentados ad libitum, también se detectó una mayor expresión proteica de UCP1 en los animales tratados con leptina. Habíamos postulado en la discusión del primer capítulo, que las ratas en un ambiente térmico de 21°C, considerado estresante (Gordon et al., 1991), intentaban regular la temperatura corporal aumentando la UCP1, pero este gasto de energía sumada a una alimentación insuficiente producía pérdida de peso y también un descenso de la temperatura corporal. En el caso de los animales ad libitum, la reducción de la ingesta provocada por la leptina no es lo suficientemente severa como para producir diferencias de peso con el grupo vehículo. Por otro lado, el aumento de UCP1 de las ratas ad libitum tratadas con leptina tampoco se tradujo en una mayor temperatura corporal (Choi et al., 2008).

Otra razón que ha quedado descartada con respecto a la ausencia del efecto preventivo de la leptina en la actividad de los animales es que la dosis de leptina (idéntica a la empleada por Exner et al, 2000) fuera una dosis baja. Esta posibilidad quedó doblemente descartada con los resultados del estudio en el que se evaluó el efecto de una dosis más alta de leptina en ratas alimentadas ad libitum y en restricción. En cuanto a las ratas ad libitum, se detectaron los mismos efectos con una dosis de leptina más alta (2 mg/ml⁻¹) que con la dosis estándar (1.29 mg/ml⁻¹), es decir, una reducción en la ingesta sin cambios en el peso corporal. También se detectó de nuevo el efecto facilitador de la actividad en la rueda, sin alcanzar diferencias significativas respecto al grupo tratado con vehículo, y el aumento significativo de la proporción de actividad diurna. Con respecto al aumento de la dosis de leptina en ratas con restricción de alimento, tampoco se detectó una reducción de la actividad media diaria, pero sí en el porcentaje de actividad diurna. Esta reducción en la proporción de la actividad diurna con respecto a la

actividad total diaria fue más marcada que con la dosis estándar y además el aumento de actividad diurna hacia el final de la fase de restricción se mantuvo por debajo del porcentaje de los animales que recibieron la dosis estándar (1.29 mg/ml^{-1}). Inesperadamente, presentaron también una buena preservación del peso y la temperatura corporal, a pesar de no haber estabilizado la carrera durante la fase ad libitum y de recibir menos cantidad de alimento diariamente en la fase de restricción (en comparación con una rata expuesta a 28 días de fase AL). Pero estos resultados pueden ser debidos a los bajos niveles de actividad durante la fase ad libitum mostrado por este grupo.

Por último, se descartó la posibilidad de que el empleo de un tipo de leptina cuyo origen es diferente a la especie de administración (leptina recombinada de ratón sobre rata, en nuestro caso) sea responsable de los resultados de actividad contradictorios con respecto al estudio de Exner et al., (2000). Al igual que en el primer estudio con una línea base de 28 días del modelo SIH, con el uso de leptina recombinada de ratón en una versión con la actividad de línea de base reducida a 14 días, no encontramos un efecto reductor de la hiperactividad por parte de la leptina, ni tampoco una mayor temperatura corporal. Pero, nuevamente, volvemos a detectar la disminución de la proporción de actividad diurna que venimos observando en todos los estudios realizados con el procedimiento SIH. Por lo tanto, el empleo de leptina de origen de rata o de ratón no es la causa de la contradicción en nuestros resultados con respecto a los de Exner (Choi et al., 2003).

Si bien el control de la ingesta durante los primeros 90 minutos después de recibir la ración diaria de comida supone una ventaja adicional a las ya comentadas anteriormente, estos estudios no están exentos de limitaciones. Por ejemplo, el reducido tamaño muestral de los grupos experimentales alojados a 25°C durante todo el procedimiento, impidió detectar diferencias significativas en determinadas variables debido al gran error típico mostrado por el grupo tratado con vehículo. Por otro lado, las infraestructuras del laboratorio en cuanto a las ruedas de actividad y sensores de telemetría no permitieron realizar todos los grupos experimentales simultáneamente, impidiendo la comparación entre algunos de ellos.

En conclusión, considerando en conjunto el efecto sutil y transitorio de la leptina sobre la actividad en los animales estudiados, junto con sus efectos adversos sobre la ingesta de alimentos publicados en la literatura (Hillebrand et al., 2005b) y el enlentecimiento de la ingesta durante los primeros noventa minutos, así como el efecto depresor final sobre la temperatura corporal, parece necesario adoptar una conclusión conservadora con respecto a la utilidad potencial de la leptina en el tratamiento de pacientes con anorexia nerviosa (Hebebrand & Albayrak, 2012; Hebebrand et al., 2003) especialmente cuando la asociación entre hipoleptinemia e hiperactividad en la anorexia nerviosa no es tan lineal como se pensaba (Stengel et al., 2017). Por otro lado, el aumento de la temperatura ambiente evita eficazmente la hiperactividad, la pérdida de peso y la hipotermia en ratas expuestas al procedimiento SIH.

Esta advertencia con respecto al posible efecto antiterapéutico de la leptina es preocupante teniendo en cuenta la ausencia actual de tratamientos efectivos en la anorexia nerviosa (Gutiérrez & Carrera, 2014). Por otra parte, los resultados aquí presentados refuerzan la investigación previa realizada con el procedimiento ABA (Cerrato et al., 2012; Gutiérrez et al., 2006, 2008, 2009) y llama a la investigación traslacional que explora la utilidad terapéutica del calor en el tratamiento de la hiperactividad en anorexia nerviosa (Carrera & Gutiérrez, 2018). Es de destacar que la hiperactividad en pacientes con anorexia nerviosa está modulada por la temperatura ambiente (Carrera et al., 2012) y proporcionar a las pacientes un ambiente cálido

de 32°C también ha demostrado su utilidad para ayudar a reducir la ansiedad postprandial en pacientes con anorexia nerviosa durante el tratamiento (Zandian et al., 2017).





CAPÍTULO QUINTO
Implicación de AMPK en las
consecuencias del modelo ABA
y en la reversión con calor





1. INTRODUCCIÓN

La anorexia nerviosa es un trastorno de la alimentación que se caracteriza por una gran pérdida de peso debida a la disminución de la ingesta e hiperactividad (Treasure et al., 2015). Debido al estado de desnutrición, las pacientes con anorexia nerviosa presentan diversas complicaciones médicas (Westmoreland, Krantz, & Mehler, 2016) y además presentan cambios neuroendocrinos en un intento por adaptarse a esa desnutrición, que en muchos casos no se revierten completamente con la recuperación del peso corporal (Singhal, Misra, & Klibanski, 2014).

Como ya hemos descrito en la introducción teórica, el modelo de Anorexia Basada en la Actividad (ABA) está considerado el mejor modelo animal análogo de la anorexia nerviosa (Gutiérrez et al., 2002), ya que reproduce los signos más conocidos de la enfermedad en humanos: pérdida de peso, alimentación restrictiva, hiperactividad, y otros como la hipotermia. A su vez, este modelo animal también reproduce las anomalías metabólicas y endocrinas secundarias a la inanición que se dan en las pacientes. Como ya hemos comentado, la exposición a una temperatura ambiente elevada es una estrategia eficaz para prevenir y revertir las consecuencias de la exposición a libre acceso a rueda de actividad y restricción de alimento (Cerrato et al., 2012; Gutiérrez et al., 2006, 2008, 2009), pero no se conocen los mecanismos por los cuales actúa, a excepción de su reducción en la sobreexpresión del sistema de melanocortinas (Gutiérrez et al., 2009).

El mantenimiento de la homeostasis energética requiere un equilibrio entre el consumo, el almacenamiento y el gasto de energía (Stanley, Wynne, McGowan, & Bloom, 2005). El sistema nervioso central (SNC) es el encargado de recibir e integrar las señales periféricas como hormonas, aferencias nerviosas y nutrientes y genera una respuesta adecuada en función del estado energético del organismo (Schneeberger, Gomis, & Claret, 2014).

1.1. REGULACIÓN DEL METABOLISMO ENERGÉTICO POR EL HIPOTÁLAMO

El hipotálamo es una área clave en la regulación de la ingesta, el gasto energético, la utilización y partición de nutrientes, la regulación de la homeostasis de la glucosa y el metabolismo periférico de los lípidos (Spiegelman & Flier, 2001; Williams, 2012). Pero también se encarga de otras funciones como son la temperatura, la reproducción, la lactancia, el ciclo sueño-vigilia, la función cardiovascular y la regulación de los ejes endocrinos (Cui, Lopez, & Rahmouni, 2017; Everitt & Hokfelt, 1990; Kalsbeek et al., 2010; Lopez, Alvarez, Nogueiras, & Dieguez, 2013; Lopez, Nogueiras, Tena-Sempere, & Dieguez, 2016; Martínez de Morentin, Urisarri, Couce, & Lopez, 2016; Rui, 2013; Saper & Lowell, 2014). Se trata de una pequeña zona diencefálica situada debajo del tálamo que está organizada en diferentes núcleos entendidos como un conjunto o clúster de neuronas conectados entre sí por proyecciones axonales. Además, no se trata de una estructura aislada, sino que está integrada con otras áreas del cerebro como la corteza cerebral, el sistema límbico y la formación reticular del tronco encéfalo, dando lugar a una compleja red de estímulos aferentes y eferentes (Martín-Moreno, Barrios, & Argente, 2006; Morton, Meek, & Schwartz, 2014). Estos núcleos hipotalámicos responden a los cambios que se producen en el estado energético del organismo modificando la expresión y síntesis de neurotransmisores específicos, tales como los neuropéptidos

orexigénicos, que promueven la ingesta, y los neuropéptidos anorexigénicos, que inhiben la ingesta y, por lo tanto, desencadenando variaciones en la ingesta y el gasto energético (Dietrich & Horvath, 2013; Rui, 2013). A continuación, haremos hincapié en algunos de los núcleos hipotalámicos más importantes a la hora de regular el balance energético, a saber, el núcleo arcuato (ARC), el núcleo ventromedial (VMH), el área hipotalámica lateral (LHA), el núcleo dorsomedial (DMH) y el núcleo paraventricular (PVH), y que aparecen representados en la Figura 36 (Rijke et al., 2005; Saper & Lowell, 2014).

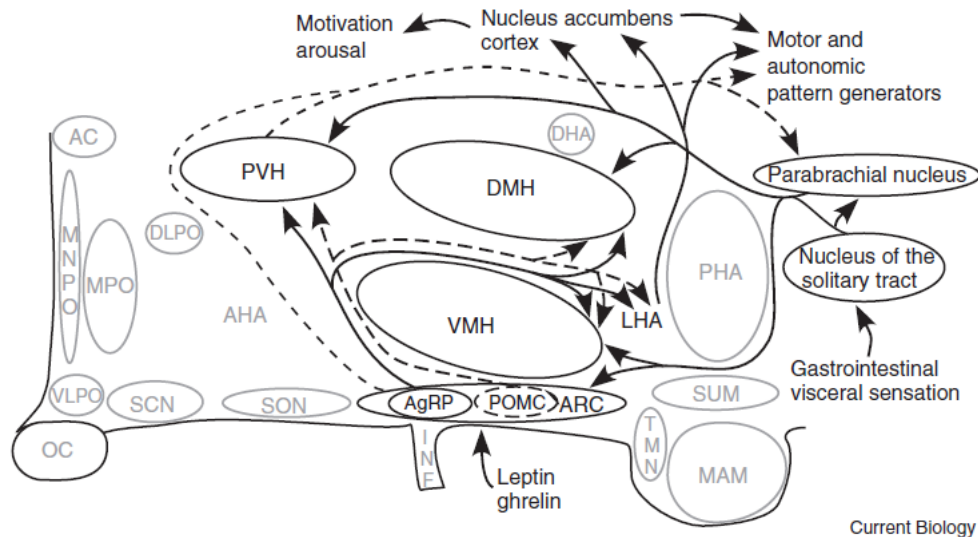


Figura 36. Esquema de los principales núcleos hipotalámicos implicados en el balance energético (marcados con líneas en negro). Extraído de Saper & Lowell, 2014. Con permiso de Elsevier.

1.1.1. Núcleo arcuato (ARC)

El ARC está considerado como uno de los principales núcleos encargados de la regulación de la ingesta. Se sitúa por debajo del VMH, a ambos lados del tercer ventrículo y adyacente a la eminencia media. Esta ubicación le otorga una posición estratégica que le permite detectar las fluctuaciones hormonales y de nutrientes en el torrente sanguíneo gracias a que posee una barrera hematoencefálica semi-permeable (Broadwell & Brightman, 1976; Lopez et al., 2013, 2016; Martínez de Morentin et al., 2016; Schneeberger et al., 2014). Por otro lado, este núcleo está formado por dos poblaciones neuronales de primer orden bien diferenciadas por el tipo de neuropéptido que expresan y que ejercen efectos opuestos. Por un lado, las neuronas POMC/CART encargadas de la inhibición de la ingesta (anorexigénicas) y por otro, las neuronas NPY/AgRP que promueven la ingesta (orexigénicas), y cuya interacción da lugar al sistema de melanocortinas responsable del control de la ingesta y el gasto energético (Barsh & Schwartz, 2002). A su vez, estas neuronas tienen proyecciones a neuronas de segundo orden en otras áreas hipotalámicas como el VMH, LHA, DMH y PVH en el que se expresan receptores de melanocortinas (Lopez et al., 2016; de Rijke et al., 2005).

- Neuronas POMC/CART: estas neuronas coexpresan los neuropéptidos proopiomelanocortina (POMC) y el transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART) que son de tipo anorexigénico. Mientras la excitación de las neuronas POMC produce la reducción

de la ingesta (Aponte, Atasoy, & Sternson, 2011), su ablación genera un fenotipo hiperfágico y obeso (Vaisse, Clement, Guy-Grand, & Froguel, 1998; Zhan et al., 2013). Este resultado es debido a la acción de la hormona estimuladora de melanocitos alfa (α -MSH), péptido precursor de POMC, que se une a los receptores de melanocortinas 3 y 4 (MC3R y MC4R), que son los que se expresan en el hipotálamo (Mercer, Hentges, Meshul, & Low, 2013). Además, la ingesta aumenta los niveles tanto de POMC como de α -MSH, mientras que el ayuno los disminuye (Schwartz et al., 1997). En cuanto a las neuronas CART, si bien se expresa en todo el cerebro, es más abundante en el hipotálamo (Elias et al., 1998). Tradicionalmente, CART ha sido clasificado como anorexigénico, ya que su administración reduce la ingesta y su inhibición produce hiperfagia (Asnicar et al., 2001; Kristensen et al., 1998; Thim, Kristensen, Larsen, & Wulff, 1998). Pero también existe evidencia de efectos orexigénicos (Abbott et al., 2001; Hou, Zheng, Zhou, & Zhou, 2010) que tendría una explicación núcleo-específica en el que CART ejerce acciones catabólicas en el ARC, mientras que en el LHA ejercería acciones anabólicas (Lau et al., 2018). También se ha descrito que este neuropéptido estimula la termogénesis en el tejido adiposo pardo (Kotz, Wang, Briggs, Levine, & Billington, 2000).

- **Neuronas NPY/AgRP:** estas neuronas coexpresan el péptido relacionado con agouti (AgRP) y el neuropéptido Y (NPY). Si bien NPY se expresa a lo largo de todo el SNC, presenta una mayor densidad en el ARC (Gehlert, Chronwall, Schafer, & O'Donohue, 1987) y en el que sus receptores Y1 e Y5 parecen ser los principales responsables de la regulación del balance energético (Nguyen et al., 2012; Sohn, Elmquist, & Williams, 2013). Se trata de un neuropéptido orexigénico ya que su expresión se reduce ante situaciones de saciedad y aumenta en condiciones de ayuno (Beck et al., 1990; Kalra, Dube, Sahu, Phelps, & Kalra, 1991). Además, la administración de NPY directamente sobre el hipotálamo produce un aumento de la ingesta (Clark, Kalra, Crowley, & Kalra, 1984) y la reducción de la termogénesis adaptativa en el tejido adiposo pardo (Egawa, Yoshimatsu, & Bray, 1991; Shi et al., 2013) que se asocia a una disminución del eje tiroideo. Las neuronas AgRP actúan como antagonistas de MC3R y MC4R (Ollmann et al., 1997) por lo que la administración central de este neuropéptido o su sobreexpresión genética da lugar a un aumento de la ingesta y una reducción del gasto energético que se traduce en un fenotipo obeso (Graham, Shutter, Sarmiento, Sarosi, & Stark, 1997; Small et al., 2003). Por el contrario, la inhibición de estas neuronas produce una reducción de la ingesta en ratones que habían sido sometidos a ayuno (Krashes et al., 2011).

Generalmente, las neuronas del ARC poseen receptores de leptina e insulina (Cui et al., 2017; Lopez, 2016, 2018; Marks, Porte, Stahl, & Baskin, 1990; Tartaglia et al., 1995) que inhiben la actividad de NPY/AgRP (Schwartz et al., 1992; Wang & Leibowitz, 1997) mientras que activan las de POMC/CART (Elias et al., 1999; Kristensen et al., 1998). La ghrelina, por su parte, estimula la actividad de las neuronas NPY/AgRP (Kamegai et al., 2001; Kojima et al., 1999) e inhibe las neuronas POMC/CART (Shintani et al., 2001). En casos de restricción calórica se produce una disminución en los niveles de leptina que en consecuencia produce un aumento de la expresión de los neuropéptidos orexigénicos y una inhibición de los anorexigénicos (Murphy & Ebling, 2011).

1.1.2. Núcleo ventromedial (VMH)

Situado inmediatamente superior al ARC, en conjunto este área fue considerado clásicamente como el “centro de la saciedad” debido a que cuando se lesionaba en animales estos desarrollaban obesidad (Hetherington & Ranson, 1940, 1942). Además de su clara

implicación en la regulación del peso corporal y la homeostasis energética también está relacionado con otras funciones como el comportamiento sexual femenino y la función cardiovascular (McClellan, Parker, & Tobet, 2006; Shimogawa, Sakuma, & Yamanouchi, 2015). El VMH recibe proyecciones del ARC y a su vez tiene conexiones con otros núcleos hipotalámicos (PVH, LHA, DMH) y extrahipotalámicos (tronco cerebral, amígdala, eminencia media, etc) (Cheung, Kurrasch, Liang, & Ingraham, 2013; Lopez et al., 2016; Martínez de Morentin et al., 2016; Noble, Billington, Kotz, & Wang, 2014; Palkovits, 2003; Seoane-Collazo et al., 2015; Shimogawa et al., 2015; Simpson, Martin, & Bloom, 2009). Contiene una población neuronal que es específica de este núcleo que expresa el factor esteroideogénico 1 (SF1) (Segal et al., 2005) y que están directamente implicadas en el correcto desarrollo del VMH y en el control del metabolismo energético (Choi, Fujikawa, Lee, Reuter, & Kim, 2013; Zhang et al., 2008). De hecho, la ablación de estas neuronas en ratones genera un fenotipo obeso (Zhang et al., 2008) que se debe a la alteración de la termogénesis (Kim et al., 2011). En el VMH también hay neuronas que expresan el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), implicado en la regulación de la ingesta y de la masa corporal (Lyons et al., 1999; Xu et al., 2003) y cuya función parece depender de la modulación que las neuronas SF1 ejercen sobre ellas (Jo, 2012). También contiene una gran cantidad de receptores de leptina, lo que lo convierte en un núcleo diana importante de esta hormona en la regulación del balance energético (Elmqvist, Ahima, Elias, Flier, & Saper, 1998).

Por último, el VMH también ha sido reconocido como un núcleo importante en el control del gasto energético a través de la regulación de la termogénesis (Contreras et al., 2014, 2015; Contreras, Nogueiras, Diéguez, Medina-Gómez, & López, 2016; Contreras, Gonzalez-Garcia, et al., 2017; Contreras, Nogueiras, Dieguez, Rahmouni, & Lopez, 2017; Gonzalez-Garcia et al., 2018; Kim et al., 2011; Lage, Ferno, Nogueiras, Dieguez, & Lopez, 2016; Lopez et al., 2010; Martínez-Sánchez et al., 2017; Martínez de Morentin et al., 2015, 2012, Seoane-Collazo et al., 2014, 2018; Whittle et al., 2012). Gracias a las conexiones anatómicas entre este núcleo y el BAT (Bamshad, Song, & Bartness, 1999), a través del núcleo del rafe pálido (RPa) y la oliva inferior (IO) en el troncoencéfalo, permite que el SNS pueda activar la termogénesis del BAT y aumentar la temperatura corporal de los animales (Contreras, Nogueiras, et al., 2017). Se postuló así, el eje VMH-SNS-BAT para la modulación de la termogénesis.

1.1.3. Área hipotalámica lateral (LHA)

Considerado el “centro del hambre”, está ubicado adyacentemente al VMH flanqueando los laterales y de forma opuesta al tercer ventrículo. Además de recibir proyecciones del ARC, también envía sus axones a otros núcleos hipotalámicos y estructuras cerebrales que le permite modular una gran variedad de funciones como el ciclo sueño-vigilia, la memoria, el aprendizaje, aspectos hedónicos relacionados con la ingesta, termorregulación, etc (Ferno, Senaris, Dieguez, Tena-Sempere, & Lopez, 2015; Gao & Horvath, 2014; Peyron et al., 1998; Takeshi Sakurai, 2014). El LHA contiene dos tipos de neuronas principales: las orexinas (OX) y las productoras de la hormona concentradora de melanina (MCH), ambas con actividad orexigénica.

- Neuronas de orexina: producen los neuropéptidos orexinas (OX-A y OX-B) también llamados hipocretinas (Hcrt1 y Hcrt2). Su expresión aumenta en condiciones de ayuno mientras que la administración a nivel central promueve la ingesta (Alvarez-Crespo et al., 2013; Lopez et al., 2000; Lopez et al., 2016; Sakurai et al., 1998). Además, también han mostrado su implicación en la actividad y la termogénesis (Nixon, Kotz, Novak, Billington, & Teske, 2012),

gracias a las proyecciones hacia el núcleo del rafe pálido que estimulan la termogénesis en ratas (Ferno et al., 2015; Morrison, Madden, & Tupone, 2012).

- **Neuronas MCH:** estas neuronas son exclusivas del LHA y proyectan a diferentes áreas del cerebro (Bittencourt et al., 1992). Al igual que ocurre con las orexinas, los niveles de MCH aumenta durante el ayuno (Qu et al., 1996) y su administración central aumenta la ingesta (Hu et al., 2002; Imbernon et al., 2013, 2016; Romero-Pico et al., 2018).

1.1.4. Núcleo paraventricular (PVH)

Este núcleo se sitúa en la parte más anterior del hipotálamo, justo encima del tercer ventrículo. Se trata de un núcleo integrador ya que recibe proyecciones axonales del ARC (Cone, 2005; M A Cowley et al., 1999) y de otras áreas extra hipotalámicas, como el núcleo del tracto solitario (NTS) (Geerling, Shin, Chimenti, & Loewy, 2010), implicadas en el balance energético. Gracias a la gran cantidad de receptores de melanocortinas presentes en este núcleo (Sutton et al., 2014), presenta una alta sensibilidad a neuropéptidos como NPY, AgRP y α -MSH (Kim et al., 2000; Stanley, Kyrkouli, Lampert, & Leibowitz, 1986). Además, las neuronas sensibles a leptina del ARC proyectan a este núcleo (Sutton et al., 2014).

Existen dos poblaciones neuronales importantes en el balance energético en este núcleo hipotalámico: las neuronas que expresan la hormona liberadora de tirotropina (TRH), que controla el eje hipotalámico-hipofisario-tiroideo, y las neuronas que expresan la hormona liberadora de corticotropina (CRH), implicada en el control del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal. LA TRH estimula en última instancia la liberación de las hormonas tiroideas (T3 y T4) y la CRH de cortisol o corticosterona (John, 2016). Ambos tipos de neuronas tienen un efecto anorexigénico puesto que producen una reducción de la ingesta cuando son estimuladas por las neuronas POMC/CART e inhibidas por las neuronas NPY/AgRP (Arase, York, Shimizu, Shargill, & Bray, 1988; Atasoy, Betley, Su, & Sternson, 2012; Fekete et al., 2001, 2002; Pandit, de Jong, Vanderschuren, & Adan, 2011). Además, su administración a nivel central reduce la ingesta (Gotoh et al., 2007; Krahn, Gosnell, Levine, & Morley, 1988; Monnikes, Heymann-Monnikes, & Tache, 1992).

1.1.5. Núcleo dorsomedial (DMH)

Se sitúa a ambos lados del tercer ventrículo anteriormente a otros núcleos hipotalámicos y está involucrado en una gran cantidad de procesos fisiológicos como el apetito, la termorregulación, el estrés y los ritmos circadianos (Schneeberger et al., 2014). También es considerado un núcleo integrador ya que recibe proyecciones de otros núcleos, especialmente del ARC, y proyecta sus axones al PVH y al LHA (Guan et al., 1998; S. J. Lee et al., 2013; Schneeberger et al., 2014). Los estudios de lesión en el DMH mostraron hipofagia e hipoactividad (Bernardis, 1970, 1972), implicando a este núcleo también en la regulación de la actividad física. En el DMH se expresan neuropéptidos como NPY, CRH y receptores de colecistocinina A (CCK-1) y de leptina (LepRb), dando lugar a la inhibición o incremento de la ingesta (Bellinger & Bernardis, 2002; Bi, Kim, & Zheng, 2012). Como ya hemos explicado anteriormente, en el modelo ABA, la hiperactividad tiene un efecto sobre la ingesta de los animales, disminuyéndola que parece estar relacionado con el DMH. Aunque no se conoce el mecanismo por el cuál este proceso tiene lugar, algunas propuestas indican que la actividad

física activaría la señalización de CRH e inhibiría la de NPY, reduciendo la ingesta (Zhang & Bi, 2018).

1.2. GASTO ENERGÉTICO Y TERMOGÉNESIS

El gasto energético abarca tres componentes: la actividad metabólica basal (que representa la energía consumida cuando el individuo se encuentra en ayunas y reposo en un ambiente de termoneutralidad), el ejercicio físico y la termogénesis facultativa o adaptativa (este hace referencia al calor producido en respuesta a la exposición al frío o a una dieta hipercalórica). Mientras que el metabolismo basal representa un 60-70% del gasto energético, y al que habría que añadirle un 10% proveniente de la termogénesis que acompaña a la digestión, absorción, distribución y almacenamiento de nutrientes, la actividad física y la termogénesis adaptativa suponen un 10% cada uno. Sin embargo, en individuos muy activos la combinación de ejercicio y termogénesis alcanza el 44% del gasto energético total, por lo que el metabolismo basal se reduciría a un 56% (Doucet et al., 2003; Hulbert & Else, 2004; Landsberg, Young, Leonard, Linsenmeier, & Turek, 2009). El tejido adiposo pardo es el responsable de la termogénesis adaptativa y es especialmente relevante en animales hibernantes, pequeños mamíferos como los roedores y en neonatos humanos (Cannon & Nedergaard, 2004). Hasta hace poco se creía que los adultos humanos no disponían de BAT, pero recientemente, gracias a la tomografía de emisión de positrones, se ha demostrado la existencia de este tejido en zonas alrededor del cuello, clavícula y médula espinal, y que además es metabólicamente activo (Cypess et al., 2009; Nedergaard, Bengtsson, & Cannon, 2007; van Marken Lichtenbelt & Schrauwen, 2011; Virtanen et al., 2009; Zingaretti et al., 2009). En relación con las pacientes con anorexia nerviosa, se ha descrito que la actividad del BAT es más baja en comparación con los controles (Bredella et al., 2010).

El BAT está compuesto por adipocitos marrones con una gran cantidad de gotas lipídicas multiloculares y mitocondrias, y presenta una gran inervación del SNS (Contreras et al., 2015). El proceso a través del cual el BAT puede producir calor consiste en el desacoplamiento del flujo de protones generado en la respiración mitocondrial permitiendo que la energía se disipe en forma de calor en lugar de formarse ATP¹⁵. Para ello es necesario la activación de la proteína desacoplante 1 (UCP1) o termogenina, que es la responsable de bombear los protones de nuevo al interior de la matriz mitocondrial (Cannon & Nedergaard, 2004; Nedergaard & Cannon, 2018; Nicholls & Locke, 1984; Porter, Chondronikola, & Sidossis, 2015; Silva, 2006).

La activación de la termogénesis depende de la inervación simpática de los adipocitos. Esto da lugar a la liberación de norepinefrina que activa los receptores β 3-adrenérgicos (β 3-AR) que están asociados a proteínas G, las cuales provocan la activación del adenilato ciclasa (AC). Esto produce un incremento del cAMP que a su vez activa la proteína quinasa A (PKA), induciendo la termogénesis. La PKA, entonces, da lugar a un aumento de la lipólisis y un aumento de los ácidos grasos libres (FFA, de las siglas en inglés *free fatty acid*), gracias a la activación de la lipasa adipocítica de triglicéridos (ATGL), la lipasa sensible a hormonas (HSL) y la monoacilglicerol lipasa (MGL) que hidrolizan los triglicéridos. A continuación, la carnitina palmitoiltransferasa 1a (CPT1a) introduce los ácidos grasos en la mitocondria donde son β -oxidados para dar lugar a NADH y FADH que serán posteriormente oxidados en la cadena de transporte de electrones y cuya energía será liberada por UCP1, como ya hemos explicado

¹⁵ Las mitocondrias, a través de la ATP sintasa, utilizan la energía generada por el movimiento de los electrones a través de la cadena respiratoria para producir ATP a partir de ADP (Boyer, 1997; von Ballmoos, Wiedenmann, & Dimroth, 2009).

anteriormente y que aparece representado en la Figura 37 (Cannon & Nedergaard, 2004; Clifford, Londos, Kraemer, Vernon, & Yeaman, 2000; Contreras et al., 2015; Holm, Fredrikson, Cannon, & Belfrage, 1987; Morimoto, Kameda, Tsujita, & Okuda, 2001; Nedergaard & Cannon, 2018; Shih & Taberner, 1995).

Por lo tanto, los ácidos grasos parecen fundamentales para el funcionamiento de UCP1. Sin embargo, recientemente se ha descubierto que ratones sin lipólisis en el BAT mantienen su actividad termogénica intacta, por lo que se ha postulado un nuevo mecanismo de activación de UCP1 que no requiere la acción de ácidos grasos (Cannon & Nedergaard, 2017; Schreiber et al., 2017; Shin et al., 2017).

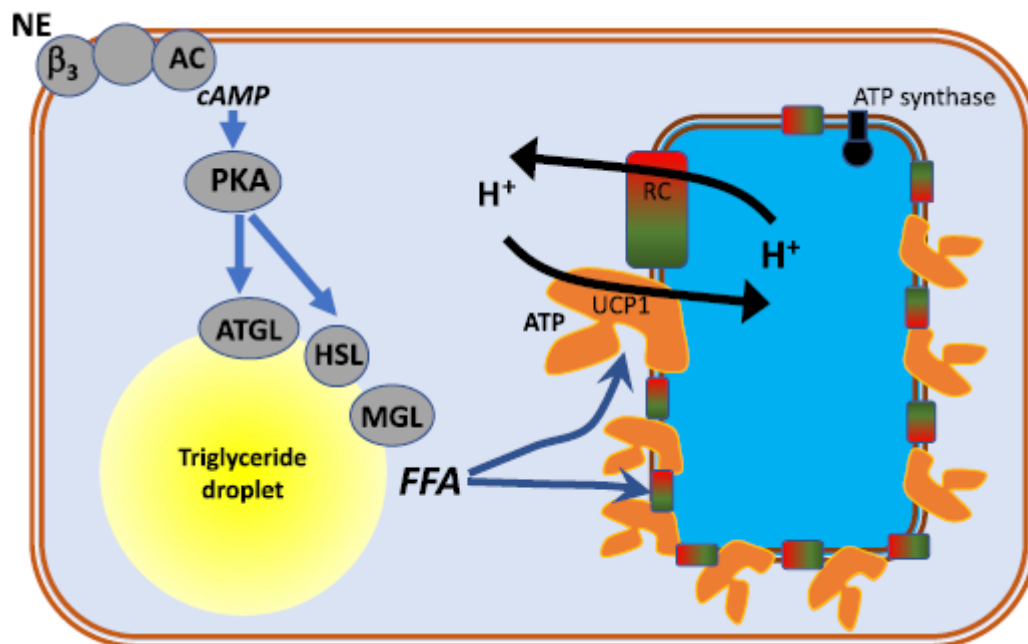


Figura 37. Visión general del mecanismo de producción de calor en el tejido adiposo pardo (BAT).
Extraído de Nedergaard & Cannon, 2018. Con permiso de Elsevier.

1.3. AMPK

AMPK es el principal sensor energético celular que, ante situaciones de escasez de energía, es decir, cuando aumenta la relación AMP/ATP, se activa para restablecer la homeostasis de la célula. Para ello pone en marcha procesos catabólicos, aquellos que permiten obtener ATP (oxidación de ácidos grasos), e inhibe los procesos anabólicos que consumen ATP (síntesis de ácidos grasos, gluconeogénesis, síntesis de proteínas, colesterol, triglicéridos), (Carling, Sanders, & Woods, 2008; David Carling, Thornton, Woods, & Sanders, 2012; Contreras et al., 2016; Hardie, 2014; Hardie, Schaffer, & Brunet, 2016; Kahn, Alquier, Carling, & Hardie, 2005; Lage, Dieguez, Vidal-Puig, & Lopez, 2008; López, 2018a; Lopez et al., 2016). Concretamente, AMPK es una proteína que forma un complejo heterotrimérico que se compone de una subunidad α catalítica y dos unidades reguladoras, β y γ (Day, Ford, & Steinberg, 2017). Así, cuando se consume más ATP del que se sintetiza, el AMP se une alostéricamente a AMPK produciendo su fosforilación, generalmente a través de dos principales quinasas *upstream*, el supresor de tumores LKB1 (*Liver Kinase B1*) y la proteína dependiente del complejo de calcio

y calmodulina (CaMKK2) (Anderson et al., 2008; Carling et al., 2008; Claret et al., 2011; Fei-Wang, Tian, Tso, & Han, 2012; Woods et al., 2005). Otros activadores de AMPK también serían, la quinasa 1 activada por TGF- β (TAK1) (Hawley et al., 2005; Woods et al., 2003; Xie et al., 2006) o la quinasa supresora de Ras (KSR2) (Costanzo-Garvey et al., 2009). Por otro lado, AMPK puede ser inhibida a través de la proteína fosfatasa 2Ca (PP2Ca), por desfosforilación (Hardie, 2007; Hurley et al., 2005; Steinberg et al., 2006).

Por lo tanto, la regulación de AMPK puede producirse de las siguientes formas:

- Directamente por la acción alostérica de AMP que inhibe PP2Ca produciendo un aumento de la fosforilación de la treonina Thr-172 por LKB1 (activación constitutiva) en la subunidad catalítica α y en consecuencia activando AMPK (Lage et al., 2008; Sanders, Grondin, Hegarty, Snowden, & Carling, 2007).
- A través del modelo de activación dependiente de Ca^{2+} que es independiente de AMP, en el que un aumento de Ca^{2+} produce la activación de CAMKK β que a su vez incrementa la fosforilación de Thr-172, activando AMPK (Sanders et al., 2007).
- Por último, un mecanismo de inhibición que produce la degradación de AMPK por ubiquitinación implica la formación de un complejo entre el efector A inductor de muerte celular por fragmentación de DNA (CIDEA) y la subunidad reguladora β (Qi et al., 2008).

AMPK se expresa en una gran variedad de tejidos, entre los que se encuentran el hígado, el músculo esquelético, tejido adiposo y el hipotálamo. Así, responde a señales hormonales y nutricionales regulando el balance energético a nivel de todo el organismo y su alteración funcional se asocia a desordenes metabólicos y hormonales (Carling et al., 2008; Carling, Zammit, & Hardie, 1987; Kahn et al., 2005; Lage et al., 2008). Además, es un regulador fundamental de la síntesis de ácidos grasos por lo que, una vez que es activada, fosforila e inactiva la acetil-CoA carboxilasa (ACC), lo que produce una inhibición del ácido graso sintasa (FAS) a través de la proteína SREBP1, y en consecuencia disminuyen los niveles de malonil-CoA. Este descenso en los niveles de malonil-CoA liberan la inhibición de CPT1, encargado de la oxidación de ácidos grasos y dando lugar a un aumento de la ingesta, tal y como se detalla en la Figura 38 (Day et al., 2017; Kahn et al., 2005; Lipovka & Konhilas, 2015; Lopez et al., 2016).

Además de su función periférica, AMPK es un sensor clave en la modulación de la homeostasis energética a nivel hipotalámico. Se expresa en gran medida en diferentes núcleos/áreas hipotalámicos como el ARC, el VMH, el PVH y el LHA y participa en la regulación de las señales orexigénicas y anorexigénicas que regulan la ingesta y el peso corporal (Day et al., 2017; López, 2018b). Así, mientras el ayuno produce un incremento de la actividad de AMPK en diferentes núcleos hipotalámicos, la realimentación lo reduce (Andersson et al., 2004; Lopez et al., 2008; Minokoshi et al., 2004). De igual forma, la activación de AMPK en el hipotálamo produce un aumento de la ingesta y del peso corporal, mientras que su inhibición promueve la hipofagia y la pérdida de peso (Andersson et al., 2004; Lopez, Lelliott, & Vidal-Puig, 2007; Minokoshi et al., 2004). Diferentes metabolitos y hormonas que controlan la ingesta como la leptina, la grelina o la glucosa, así como agentes farmacológicos, modulan la actividad de AMPK (He, Zhang, Deng, Wang, & Huang, 2014; Kim et al., 2004; Lopez, 2017, 2018c; Lopez et al., 2016; Martinez de Morentin et al., 2012; Seoane-Collazo et al., 2014).

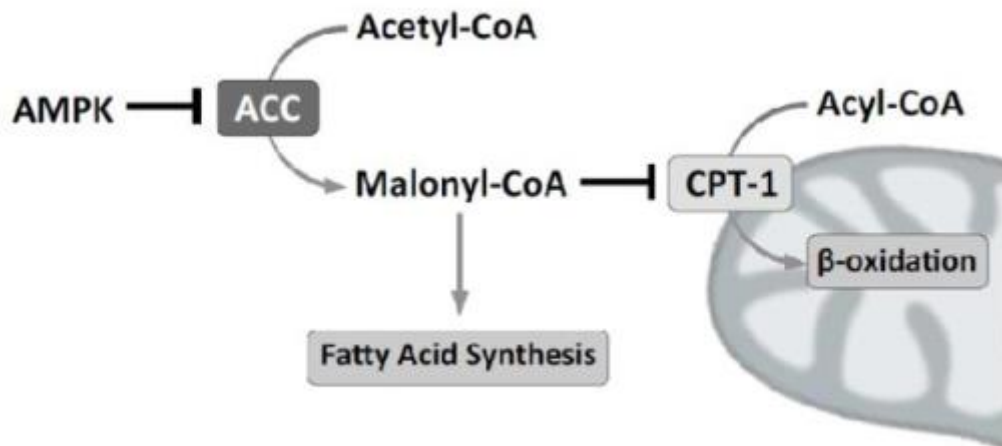


Figura 38. Visión general de la regulación del metabolismo lipídico por AMPK. Extraído de (Lipovka & Konhilas, 2015). Licencia Creative Commons.

En los últimos años, la investigación ha venido demostrando la relación existente entre AMPK y la termogénesis en el BAT. Numerosos estudios muestran como diferentes señales periféricas, tales como la leptina, el estradiol, la nicotina, el liraglutide o la proteína morfogénica ósea 8 B (BMP8B), que activan la termogénesis en el BAT, llegan al hipotálamo y actúan a través de un mecanismo común. Este mecanismo es la inhibición de AMPK hipotalámico, concretamente en el núcleo ventromedial, que permite la activación de las fibras simpáticas que conectan con el BAT (Beiroa et al., 2014; Contreras, Gonzalez-Garcia, et al., 2017; Gonzalez-Garcia et al., 2018; Lopez et al., 2010; Martinez-Sanchez et al., 2017; Martinez de Morentin et al., 2014, 2012; Martins et al., 2016; Seoane-Collazo et al., 2014; Tanida, Yamamoto, Shibamoto, & Rahmouni, 2013; Whittle et al., 2012).

Estos estudios se realizaron en un contexto de obesidad, intentando reducir la cantidad de lípidos, y por lo tanto del peso corporal, de animales obesos a través del aumento de la termogénesis adaptativa del BAT, lo que implica una inhibición de AMPK. Aunque en menor medida, también se realizaron estudios en un contexto de balance energético negativo, como el hipertiroidismo (Lopez et al., 2010), demostrando que dicho balance negativo es a consecuencia del efecto que las hormonas tiroideas ejercen sobre el BAT, a través de la modulación de AMPK, presentando así una gran actividad termogénica y pérdida de peso a pesar de una marcada hiperfagia.

Así, teniendo en cuenta la teoría termorregulatoria de la hiperactividad, los resultados de los niveles de UCP1 en ratas calentadas a 32°C en el modelo SIH y las implicaciones de AMPK tanto en la ingesta como en la regulación de la temperatura corporal, esta quinasa podría ejercer un papel importante en la homeostasis energética de la anorexia nerviosa y modular el efecto que la elevación de la temperatura ambiente tiene sobre el modelo. Además, AMPK media los efectos orexigénicos de la olanzapina, antipsicótico estudiado para prevenir el desarrollo de ABA, y que implica un aumento de la temperatura corporal o inhibición de la hipotermia (He et al., 2014; Skrede et al., 2014).

La importancia del estudio de AMPK reside en que se ha convertido en un potencial objetivo terapéutico para diversas enfermedades metabólicas que involucran conductas

alimentarias alteradas que pueden generar un balance energético positivo (obesidad y diabetes) o negativo (lipodistrofias, hipertiroidismo, anorexia producida por cáncer). Sin embargo, no se conoce la implicación que podría existir con respecto a la anorexia nerviosa, ni en el proceso de recuperación a través de la manipulación de la temperatura ambiente. Por lo tanto, en este capítulo, se analizará la ruta de AMPK hipotalámica, en su posible implicación en la regulación del balance energético de ratas sometidas al modelo ABA y cómo afecta el aumento de la temperatura ambiente a esta regulación.

2. MÉTODO

2.1. SUJETOS

Ochenta y tres ratas macho Sprague-Dawley, de unas 7 semanas de edad y con un rango de peso de 160-170 g, fueron adquiridas en el Animalario Central de la Universidad de Santiago de Compostela (USC). Las ratas fueron alojadas comunalmente a su llegada al estabulario con comida y agua ad libitum, siendo el ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, de 8:00 a 20:00 h. La temperatura ambiente se estableció en $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

2.2. APARATOS

Para la realización de los estudios se utilizaron los mismos aparatos que los empleados en los anteriores capítulos, en los que se presentan los resultados obtenidos con el modelo SIH.

2.3. PROCEDIMIENTO

Al igual que con la realización de los estudios con el modelo SIH, las ratas fueron encargadas de forma sucesiva en tandas de 12 ratas de cada vez.

Nuevamente, antes de comenzar el experimento, todas las ratas fueron operadas para la implantación de un transmisor de temperatura corporal y actividad (G2 E-Mitter; Respironics Mini Mitter Inc.). Tras la cirugía, y para verificar el bienestar de los animales, estos fueron alojados individualmente durante siete días y se monitorizó diariamente la ingesta, el consumo de agua y el peso corporal, además de realizar una valoración de la herida y el aspecto físico del animal.

En la Figura 39 se detallan las condiciones y las fases por las que pasan los animales y los grupos experimentales de los que consta cada uno de los dos estudios que componen este capítulo. En primer lugar, se realizaron las tandas de los animales Activos, ya que en función de los días que tardan en alcanzar el criterio de pérdida de peso del 20% (CPP20%) en la primera fase, y los días que tardan en alcanzar el criterio de pérdida de peso del 75% o el criterio de recuperación (peso corporal en el día n superior al de $n-4$), los animales Inactivos van a permanecer en cada una de las fases la mediana de días correspondiente. Así, a partir de ahora, los términos Activo e Inactivo harán referencia a animales o grupos de animales con o sin acceso a rueda de actividad, respectivamente.

El procedimiento comenzó y se desarrolló, tal y como hemos descrito en el apartado 4.1 de Diseños Experimentales del capítulo segundo: Material y Método.

En el Estudio 2, además de los dos grupos experimentales Activos (uno a 21°C y otro a 32°C) y los dos grupos Inactivos (también uno a 21°C y otro a 32°C), se añadió un grupo adicional en el que las ratas permanecieron con acceso a rueda de actividad, comida ad libitum y con una temperatura ambiente establecida en 21°C, durante todo el experimento. Estos animales fueron pesados y su ingesta fue monitorizada entre las 10:30 y las 11:00 horas. La duración del experimento para este grupo dependió de la mediana de días que tardaron las ratas Activas en finalizar el experimento, que fue de 10 días.

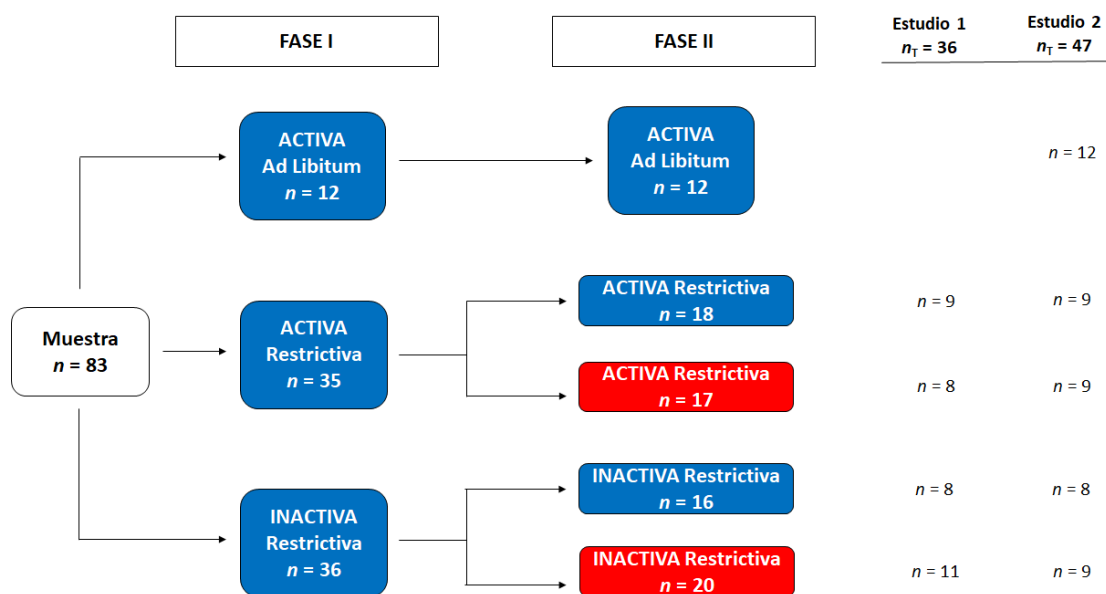


Figura 39. Detalle del procedimiento, de fases y número de animales utilizados. El color de las cajas representa la temperatura ambiente a la que fueron alojados los animales: azul = 21°C y rojo = 32°C. A la derecha de la imagen aparece representada la composición de la muestra para el Estudio 1 y el Estudio 2.

Una vez finalizado el experimento, todos los animales fueron sacrificados mediante decapitación, después de la rutina de pesado, para la extracción de tejidos: cerebro, sangre, tejido adiposo pardo (BAT), tejido adiposo blanco (WAT), músculo de la pata trasera izquierda e hígado. Los diferentes tejidos fueron congelados y almacenados en congeladores a -80°C hasta su análisis.

2.4. TÉCNICAS ANALÍTICAS

A lo largo de este estudio se realizaron diferentes técnicas moleculares que ya fueron descritas en el capítulo de Material y Método: western blot, PCR-Real Time, determinaciones séricas, histología con hematoxilina/eosina, inmunohistoquímica y tinción oil red y determinación de triglicéridos, colesterol y glucógeno hepático.

2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se expresaron como media \pm S.E.M. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando IBM SPSS Statistics versión 21.0 (IBM Corp. Armonk, NY, EE. UU.). Para analizar las variables de peso corporal, actividad en la rueda y temperatura corporal se empleó un análisis de varianza de medidas repetidas a lo largo de los días (ANOVA) tomando como factores independientes la temperatura ambiente (21°C y 32°C) y la condición de actividad (Activa vs Inactiva). Las demás variables fueron analizadas a través de ANOVA Univariante, con los mismos factores que para el ANOVA de medidas repetidas, o a través un ANOVA de una vía cuando se compararon todos los grupos. Para comparaciones entre dos grupos experimentales se empleó la prueba *t* de Student. Cuando la Prueba de Esfericidad de Mauchly fue significativa, se aplicó la corrección Greenhouse-Geisser. Para todos los análisis se tomó un alfa de 0.05.

3. RESULTADOS

3.1. ESTUDIO DE LA TERMOGÉNESIS ADAPTATIVA Y LA POSIBLE IMPLICACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE AMPK EN EL MODELO ABA

3.1.1. Procedimiento ABA: el aumento de la temperatura ambiente hasta 32°C revierte las consecuencias del modelo ABA

Durante el procedimiento ABA estudiamos las variables de actividad en la rueda, peso corporal, ingesta y temperatura corporal. Primero se presentarán los resultados obtenidos en la primera fase (Fase I), en la que todos los animales de la condición Activa e Inactiva están a una temperatura ambiente de 21°C, y después los de la segunda fase (Fase II), cuando se hace el cambio de temperatura ambiente. Los datos fueron analizados y representados, en los animales Activos e Inactivos, en función del tiempo requerido por cada rata Activa para alcanzar el CPP 20%. Si bien se presentan la Media y el SEM para los grupos al completo, los animales alcanzaron el criterio CPP20% en días diferentes, siendo la primera rata en lograrlo a los cuatro días de comenzar el experimento. Por ello, en el eje de abscisa sólo se pueden representar los datos de los cuatro días (Día -3, Día -2, Día -1 y Día CPP20%), anteriores al día en que cada animal de forma individual, alcanzaron el CPP20%.

En la Figura 40A se representó la actividad en la rueda de los animales Activos, la cual aumentó progresivamente con el paso de los días, $F(1.3, 20.9) = 54.145$; $p < 0.0001$, sin diferencias entre ambos grupos, $F(1, 15) = 0.003$; $p = 0.958$.

Con respecto al peso corporal, no se detectaron diferencias significativas entre los grupos al momento de iniciar el experimento, $F(3, 32) = 0.674$; $p = 0.574$. A la vez que la actividad en la rueda aumentaba desde que los animales entraron en experimento hasta que alcanzaron el CPP20%, el peso corporal, representado en la Figura 40B, disminuía, $F(1.5, 48.6) = 110.601$; $p < 0.0001$. Aunque las ratas Activas perdieron peso más rápidamente que las Inactivas, $F(1.5, 48.6) = 23.935$; $p < 0.0001$, el efecto principal para este factor no alcanzó la significación, $F(1, 32) = 3.112$; $p = 0.087$, aunque sí se detectaron diferencias significativas en el día que se alcanzó el CPP20%, $F(1, 32) = 15.391$; $p < 0.0001$, tal y como reveló el ANOVA univariante realizado para ese día.

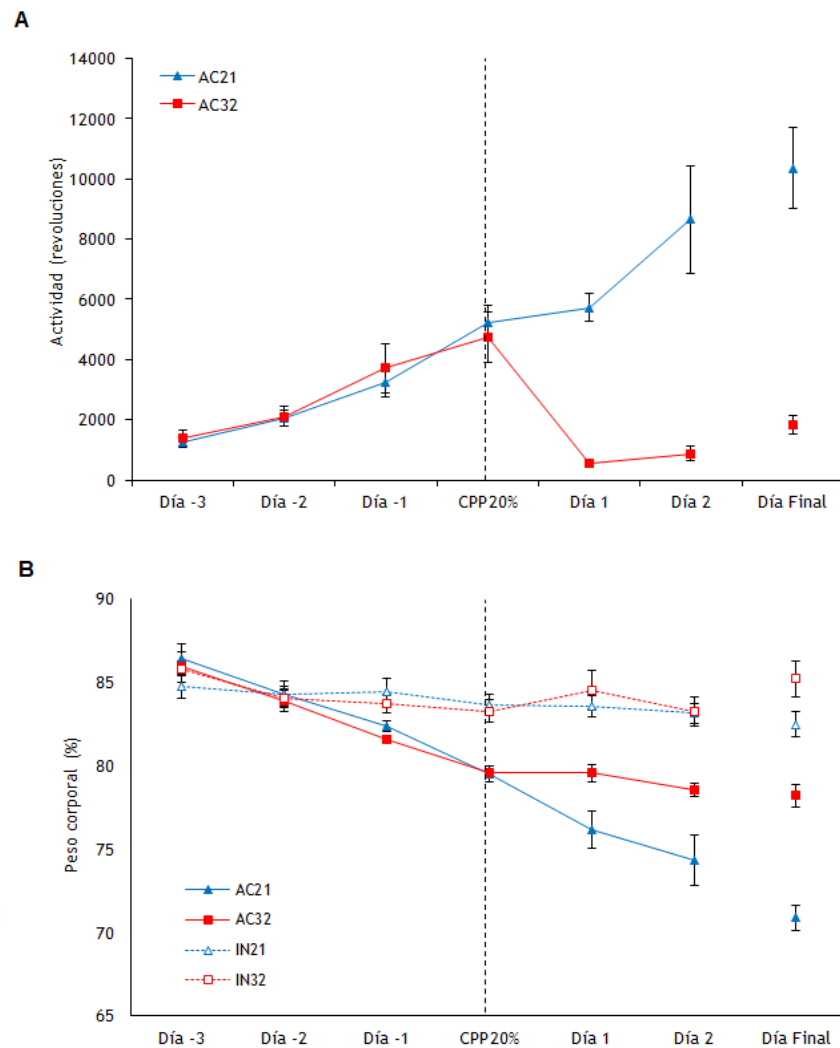


Figura 40. Actividad diaria en la rueda (A) y peso corporal relativo al peso en el Día 0 (B) durante los días previos y posteriores a alcanzar el CPP20%, y el Día Final. La línea vertical punteada indica el momento en el que se elevó la temperatura ambiente a 32°C para los grupos AC32 e IN32. Todos los datos se expresan como media \pm SEM.

Por otro lado, teniendo en cuenta la posterior asignación a las condiciones de temperatura ambiente elevada y estándar, tampoco se detectaron diferencias en el peso corporal, $F(1, 32) = 0.117$; $p = 0.735$.

En la Figura 41A, la temperatura corporal descende con el paso de los días hasta alcanzar una pérdida de peso del 20%, $F(1.8, 49.1) = 33.032$; $p < 0.0001$. Como se puede observar en la Tabla 29, el ANOVA de medidas repetidas mostró un efecto principal significativo para los factores Actividad, y la interacción de Actividad y TA (todas las $p < 0.05$) con los factores de interacción también significativos (todas las $p < 0.01$). Esto indicó que las ratas Inactivas tienen una menor temperatura corporal con respecto a las ratas Activas, y que las diferencias en esta primera fase, en la que la temperatura ambiente es la misma para todos los grupos, se deben al grupo Inactivo a 21°C, el cual presenta una temperatura corporal menor a los demás grupos.

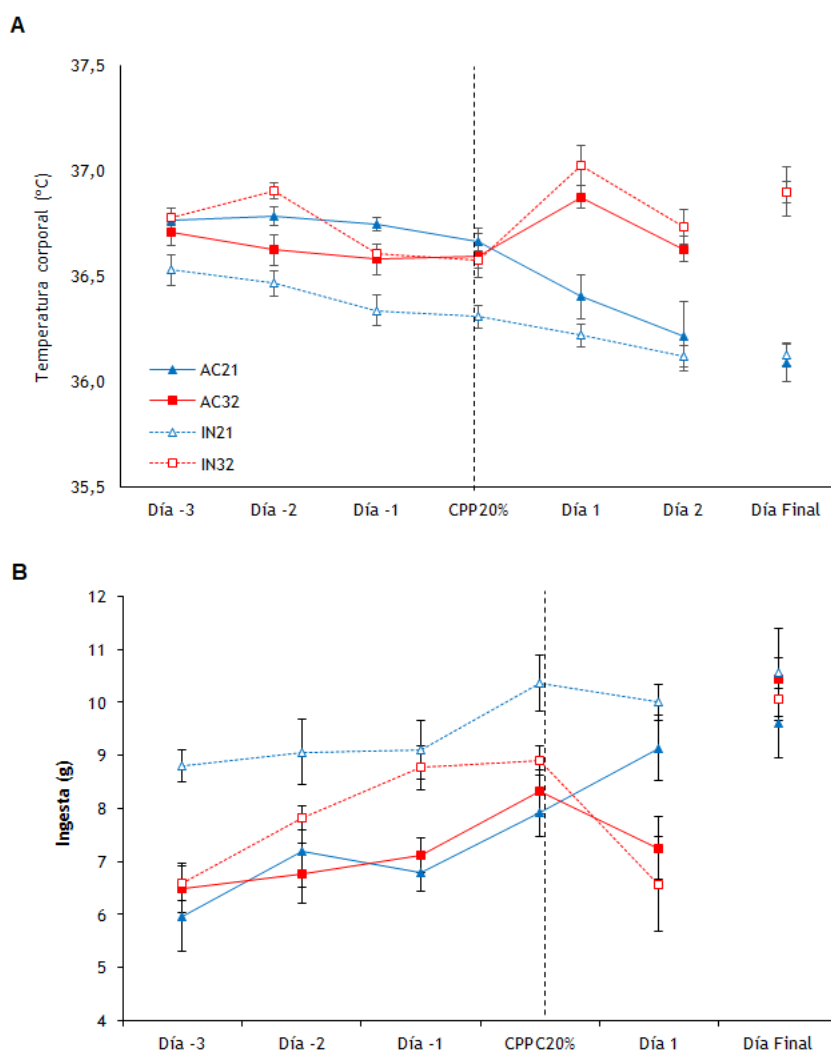


Figura 41. Temperatura corporal (A) e ingesta diaria (B) durante los días previos y posteriores a alcanzar el CPP20%, y el Día Final. La línea vertical punteada indica el momento en el que se elevó la temperatura ambiente a 32°C para los grupos AC32 e IN32. Sólo se muestran seis puntos en el eje de abscisas para la ingesta ya que el experimento se terminó después de haber registrado el peso y antes de registrar la ingesta. Todos los datos se expresan como media \pm SEM.

	Factor Interacción	Efecto principal
Días x TA	F (1.8, 49.1) = 1.451; p = 0.244	F (1, 27) = 3.039; p = 0.093
Días x ACTIVIDAD	F (1.8, 49.1) = 8.298; p = 0.001	F (1, 27) = 4.718; p = 0.039
Días x TA x ACTIVIDAD	F (1.8, 49.1) = 5.159; p = 0.011	F (1, 27) = 14.288; p = 0.001

Tabla 29. Valores de F, grados de libertad y significación para los Factores de Interacción y para los efectos principales del ANOVA de medidas repetidas realizados para la variable de temperatura corporal. Se han tomado como Factores la temperatura ambiente (TA) y la condición de acceso a rueda de actividad o no (ACTIVIDAD).

Debido a que el cambio de la temperatura ambiente se hace después de la rutina de pesaje y antes de dar la comida, la primera fase para la ingesta comprende los tres primeros días (excluyendo el Día CPP20%). La Figura 41B representa la ingesta de los cuatro grupos durante la primera fase, la cual aumenta con el paso de los días, $F(2, 72) = 12.943$; $p < 0.0001$. La ingesta de las ratas Activas fue inferior al de las ratas Inactivas, $F(1, 32) = 17.164$; $p < 0.0001$.

Además, se observó interacción para la combinación de ambos factores, $F(2, 64) = 3.155$; $p = 0.049$, pero el efecto principal no alcanzó la significación, $F(1, 32) = 3.220$; $p = 0.082$, por lo que los animales que después fueron asignados a una temperatura ambiente de 32°C comieron menos durante la primera fase, a pesar de que en ese momento todos los animales se mantuvieron a 21°C . Esto parece ser el resultado de los datos obtenidos en las ratas Inactivas, pues mientras las ratas Inactivas que posteriormente serán asignadas a la condición de TA a 32°C mostraron un claro aumento de la ingesta durante esta primera fase, las ratas Inactivas que continuarán a 21°C comienzan con una ingesta superior pero estable a lo largo de los días.

La segunda fase comenzó una vez que los animales Activos alcanzaron el CPP20% y fueron asignados a una temperatura ambiente estándar de 21°C o a una temperatura elevada de 32°C . Esta segunda fase duró, en el caso de los animales Activos, hasta que los animales alcanzaron el criterio de retirada o el de recuperación. Asimismo, los animales Inactivos fueron asignados a una u otra temperatura ambiental en función de la mediana de días que tardaron las ratas Activas en alcanzar el criterio de CPP20%. Del mismo modo, fueron retiradas del experimento una vez transcurridos la mediana de días que tardan los animales Activos en alcanzar el criterio de retirada, para los animales a temperatura ambiente estándar de 21°C , o el criterio de recuperación para los animales a temperatura elevada de 32°C . Al igual que ocurría en la Fase I, durante esta segunda fase, los animales alcanzan los criterios en días diferentes, por lo que en el eje de abscisas se representaron los primeros días hasta que el primer animal alcanzó algún criterio. Debido a que entre el Día 2 y el Día Final, el número de días que transcurre para cada rata es diferente, se representó como un punto y no como una línea continua. De todas formas, una rata del grupo Activo a 21°C tuvo que ser retirada al día siguiente de alcanzar el criterio de pérdida de peso del 20%. Para que el análisis estadístico y las gráficas representasen mejor lo sucedido con estos animales en esta segunda fase, se decidió añadir un segundo día, por lo que los grados de libertad, que representan el tamaño muestral, aparecen reducidos en un individuo.

En la Figura 40A aparece representado el nivel de actividad en la rueda, donde se puede observar que las ratas a 21°C duplicaron la carrera con respecto a la Fase I, mientras que las ratas calentadas a 32°C redujeron su actividad un 61% también con respecto a la Fase I. El ANOVA de medidas repetidas indicó que las ratas mantenidas a 21°C corrieron 6 veces más que las ratas calentadas a 32°C , $F(1, 14) = 39.120$; $p < 0.0001$. De hecho, las ratas a 32°C no llegaron a alcanzar nunca la actividad mostrada en el último día de la primera fase (Día CPP20%), a pesar de que este grupo se mantuvo en experimento una mediana de 4 días más que las ratas a 21°C .

Respecto al peso corporal (Figura 40B), la interacción y el efecto principal significativo para el factor actividad, $F(1.6, 49.8) = 9.576$; $p = 0.001$ y $F(1, 31) = 37.079$; $p < 0.0001$, respectivamente, indicó que las ratas Activas pierden peso mientras que las ratas Inactivas lo mantienen estable. También se detectó una interacción y un efecto principal significativo para el factor temperatura, $F(1.6, 49.8) = 13.865$; $p = 0.001$ y $F(1, 31) = 7.482$; $p = 0.010$, por lo que las ratas Activas mantenidas a 21°C pierden más peso que las ratas calentadas a 32°C , y que, en las ratas Inactivas, el aumento de la temperatura permitió que aumentaran de peso.

La Figura 41A representa la temperatura corporal. El ANOVA de medidas repetidas sólo detectó interacción y efecto principal significativos para el factor temperatura, $F(2, 52) = 10.240$; $p < 0.0001$ y $F(1, 26) = 67.678$; $p < 0.0001$, respectivamente. Esto indicó que tanto las ratas Activas como las Inactivas presentaron una mayor temperatura corporal cuando estas fueron calentadas a 32°C .

La ingesta durante la segunda fase comprende desde el Día CPP20% hasta el Día Final y aparece representada en la Figura 41B. El ANOVA de medidas repetidas reveló una interacción y un efecto principal significativo para el factor TA, $F(1.6, 54.0) = 9.969$; $p < 0.0001$, y $F(1, 32) = 5.274$; $p = 0.028$, respectivamente, que indicó que las ratas mantenidas a 21°C comieron más que las ratas calentadas a 32°C aunque en el Día Final no se detectaron diferencias significativas, $F(1, 32) = 0.074$; $p = 0.788$. Por lo tanto, las diferencias de ingesta a lo largo de la segunda fase se deben a que las ratas a calor reducen su ingesta a las 24 horas de encender la lámpara, pero consiguen alcanzar la ingesta de las ratas mantenidas a 21°C. Por ello, se analizó la ingesta acumulada en los dos últimos días antes de que los animales fueran retirados del experimento y cuya media y SEM se representa a continuación: AC21, 18.21 ± 1.17 g; AC32, 20.1321 ± 0.83 g; IN21, 20.5621 ± 1.04 g; IN32, 17.6921 ± 0.84 g. Sin embargo, tampoco se detectaron diferencias significativas.

3.1.2. Estudio del tejido adiposo pardo: El aumento de la temperatura ambiente hasta 32°C reduce la termogénesis en el BAT

El primer paso fue evaluar los marcadores termogénicos que se expresan en el BAT. En la Figura 42A aparece representado los niveles de mRNA para cuatro marcadores termogénicos en BAT: UCP1, UCP3, PGC1 α y PGC1 β .

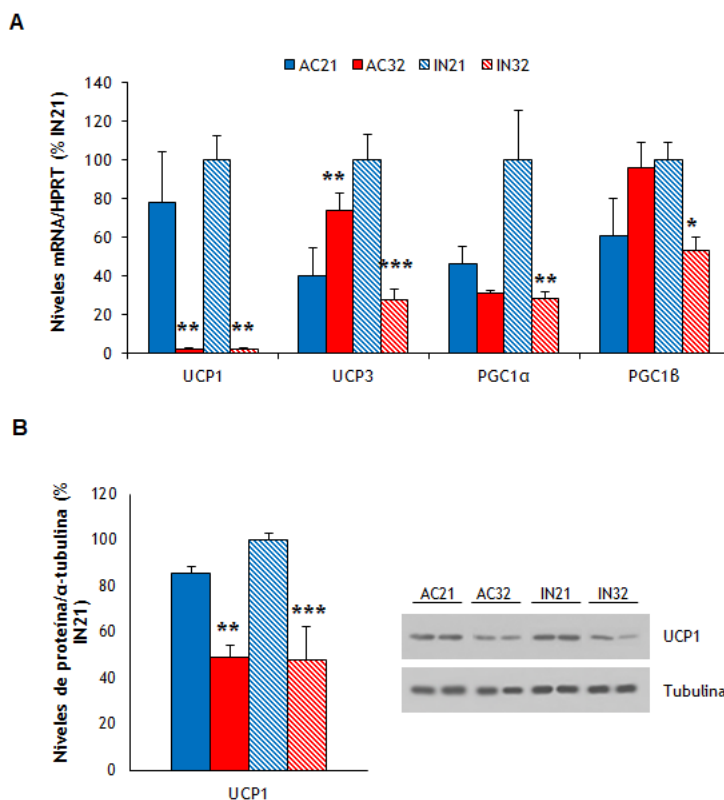


Figura 42. Cuantificación de los niveles de mRNA de marcadores termogénicos (A), niveles de proteína de UCP1 (panel izquierdo) e imágenes autorradiográficas representativas (panel derecho) (B), en el BAT. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-11$ animales por grupo experimental.

El ANOVA univariante reveló que sólo el factor temperatura produjo diferencias significativas en UCP1 y PGC1 α , $F(1, 26) = 26.445$; $p < 0.0001$, y $F(1, 27) = 9.756$; $p = 0.004$, respectivamente. Esto indicó que las ratas calentadas a 32°C mostraron niveles más bajos de estos dos marcadores comparado con las ratas mantenidas a 21°C, tanto cuando el grupo pertenece a la condición Activa como cuando pertenece a la condición Inactiva (todas las $p < 0.01$, excepto para las ratas Activas en el marcador de PGC1 α). Con respecto a los niveles de UCP3 y PGC1 β , ningún factor resultó ser estadísticamente significativo.

En la Figura 42B se puede observar como esta reducción en los niveles de mRNA de los diferentes marcadores termogénicos, se traducen también a nivel proteico. El ANOVA univariante determinó que únicamente el factor temperatura determina los valores de UCP1, $F(1, 22) = 27.739$; $p < 0.0001$, por lo que las ratas a una TA de 32°C mostraron los niveles de UCP1 reducidos en comparación a las ratas a 21°C, tanto en las ratas Activas como en las Inactivas (todas las $p < 0.05$).

Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que el calor reduce el programa termogénico en el BAT de ratas sometidas al modelo ABA.

3.1.3. El estudio de la ruta de AMPK en hipotálamo entero de rata no detectó diferencias significativas

A continuación, decidimos explorar si estas diferencias en el programa termogénico del BAT estarían mediadas por la actividad de AMPK en el hipotálamo. Para ello estudiamos la vía de señalización de AMPK en el hipotálamo entero.

Cómo se puede observar en la Figura 43, no se detectaron cambios en los distintos enzimas de la vía de señalización de AMPK hipotalámica, a excepción de FAS. El ANOVA Univariante detectó un efecto significativo del factor temperatura e interacción entre ambos factores (temperatura y actividad), $F(1, 24) = 7.968$; $p = 0.009$ y $F(1, 24) = 9.816$; $p = 0.005$. Esto indicó que en las ratas Inactivas a 21°C presentaron los niveles más altos de FAS con respecto a los demás grupos.

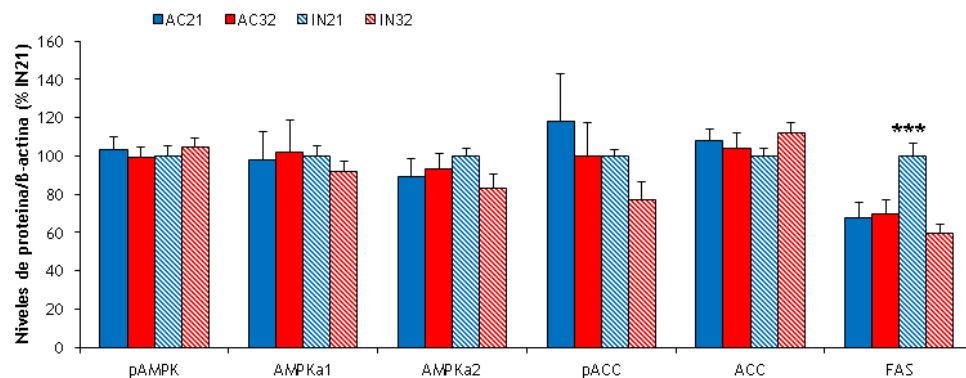


Figura 43. Niveles de proteína de la ruta de AMPK en el hipotálamo entero. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-8$ animales por grupo experimental.

3.1.4. Estudio de la vía de AMPK en dos núcleos hipotalámicos: VMH y ARC

A consecuencia de los resultados obtenidos con el estudio del hipotálamo entero, realizamos el mismo análisis en dos núcleos hipotalámicos: el núcleo ventromedial, conocido por su implicación en la regulación de la termogénesis del BAT, y el núcleo arcuato, cuya función principal es el control de la ingesta.

En la Figura 44A se muestran las principales proteínas de la vía de señalización de AMPK en el núcleo ventromedial del hipotálamo: pAMPK, pACC y FAS. En cuanto a pAMPK, esta se presentó reducida en los animales Inactivos, $F(1, 28) = 7.948$; $p = 0.009$, independientemente de la temperatura ambiente. Por otro lado, el ANOVA Univariante para pACC reveló un efecto significativo del factor temperatura e interacción entre ambos factores, $F(1, 26) = 9.207$; $p = 0.005$, y $F(1, 26) = 6.509$; $p = 0.017$, respectivamente, lo que mostró que los animales Activos a 32°C mostraron unos niveles de pACC mucho más reducidos que los demás grupos (todas las $p < 0.05$).

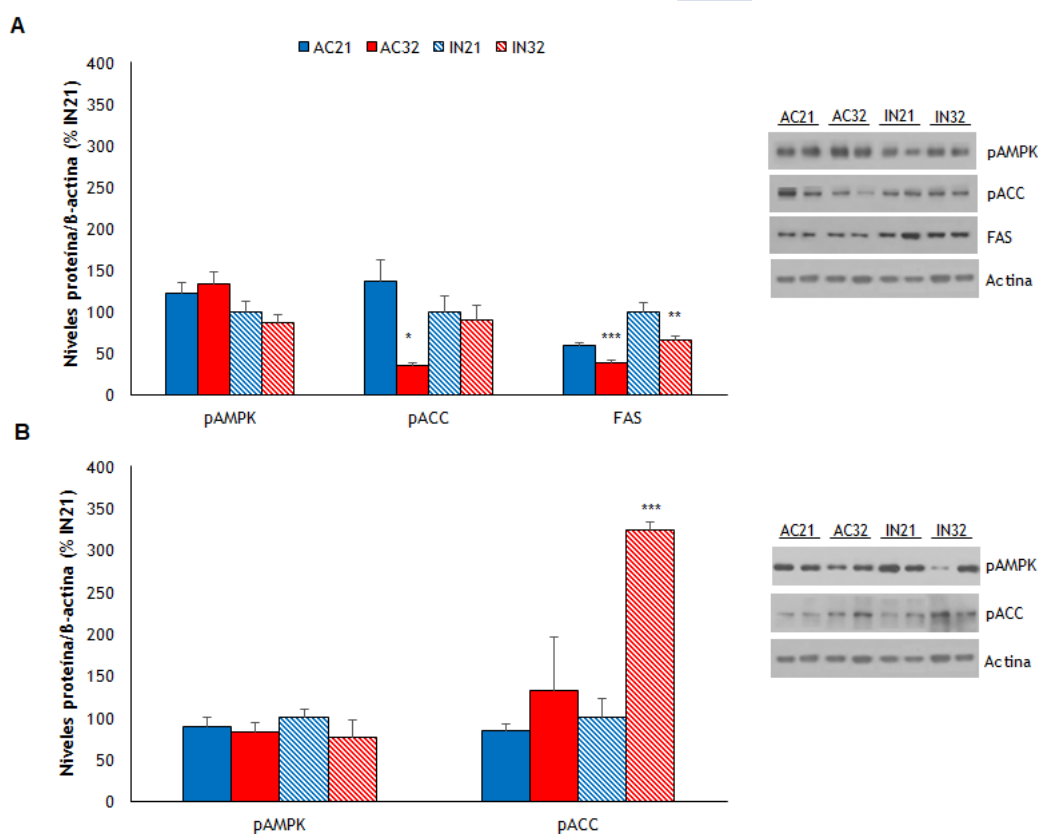


Figura 44. Niveles proteicos de la vía de AMPK en el núcleo ventromedial (panel izquierdo) e imágenes autorradiográficas representativas (panel derecho) (A), y niveles de proteína de la ruta de AMPK en el núcleo arcuato (panel izquierdo) e imágenes autorradiográficas representativas (panel derecho) (B). Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-8$ animales por grupo experimental.

Con respecto a FAS, se detectó un efecto significativo para el factor temperatura, $F(1, 25) = 13.037$; $p = 0.001$, y para el factor actividad, $F(1, 25) = 19.037$; $p < 0.0001$, lo que indicó que la exposición a una temperatura ambiente elevada redujo los niveles de FAS en ambas

condiciones de actividad (ambas $p < 0.01$), y a su vez, las ratas Inactivas presentaron niveles más elevados de FAS con respecto a las ratas Activas. Si bien el análisis post-hoc solo reveló tendencia para la disminución de FAS en las ratas AC21 con respecto a sus homólogas Inactivas, $p = 0.084$, si realizamos una t de Student para estos grupos sí se detectan diferencias significativas, $t(11) = 3.765$; $p = 0.003$.

Como se puede observar en la Figura 44B, se muestran los niveles proteicos de pAMPK y pACC en el arcuato. No se detectaron diferencias entre los grupos en pAMPK pero en cuanto a pACC, si bien los factores temperatura y actividad se mostraron significativos, $F(1, 22) = 17.531$; $p < 0.0001$, y $F(1, 22) = 10.160$; $p = 0.004$, respectivamente, esto se debe a que los animales Inactivos a 32°C presentaron niveles más altos con respecto a los demás grupos.

Por lo tanto, pAMPK no parece regular la lipogénesis *de novo* en el núcleo ventromedial o el núcleo arcuato.

3.1.5. Estudio de la ruta de AMPK en el hígado: la lipogénesis *de novo* no está mediada por AMPK

Como ya hemos especificado en la introducción de este capítulo, la homeostasis energética requiere de la comunicación entre los tejidos periféricos y el SNC que se realiza a través de señales que llegan al cerebro por el torrente sanguíneo. El hígado es un órgano muy importante en el metabolismo energético ya que actúa como un centro que conecta con otros tejidos tales como el adiposo o el músculo esquelético (Rui, 2014), y además es un órgano que presenta graves daños en pacientes con anorexia nerviosa y que pueden ser revertidos con la renutrición (Mehler & Brown, 2015; Narayanan, Gaudiani, Harris, & Mehler, 2010; Rautou et al., 2008). Por ello, en relación con el hígado se estudió la implicación de la ruta de AMPK en el metabolismo lipídico.

La Figura 45A muestra los niveles proteicos de dos principales enzimas de la ruta de AMPK en el hígado: pAMPK y pACC. Los ANOVA Univariante realizados para cada proteína mostraron un efecto significativo para los factores temperatura y condición de actividad, por lo que los animales calentados a 32°C y los animales Inactivos mostraron niveles más elevados. Se realizaron análisis post-hoc para conocer las diferencias en función de la temperatura ambiental en cada condición de actividad. Así, el aumento de los niveles de pAMPK a causa de un ambiente más cálido, fue significativo en las ratas Inactivas ($p < 0.0001$). Esto también ocurre con pACC, aunque en las ratas Activas hubo una tendencia, $p = 0.067$. Por último, no se detectaron diferencias en ninguno de los enzimas al comparar las ratas Activas a 21°C con sus homólogas Inactivas. Estos resultados indican que el calor parece inhibir la lipogénesis *de novo* en el hígado, debido al aumento de los niveles de pAMPK y pACC.

Sin embargo, los niveles de triglicéridos circulantes y hepáticos (Figura 45B-D) se presentaron aumentados en los animales calentados a 32°C y los animales Inactivos. Mientras que este aumento de triglicéridos circulantes en las ratas expuestas a calor fue significativo tanto para las ratas Activas como Inactivas, en el caso de los triglicéridos hepáticos sólo fue significativo en las ratas Activas (todas las $p < 0.0001$). Además, las ratas IN21 siempre presentaron mayores valores que las ratas AC21 (ambas $p < 0.001$). Por otro lado, la tinción de cortes de hígado con Oil Red no detectó presencia de grasa en el tejido (Figura 45C). Con respecto a los niveles de colesterol circulantes y hepáticos encontramos diferentes resultados. Mientras los niveles circulantes de colesterol están más elevados en los animales Inactivos y

calentados a 32°C, los niveles de colesterol hepático se presentan, al contrario, es decir, más altos en los animales Activos y mantenidos a 21°C. En cuanto a los niveles de glucógeno en el hígado (Figura 45E), solo se detectó una significativa interacción entre los factores, $F(1, 28) = 16.031$; $p < 0.0001$, que indicó que, en el caso de los animales Activos, el calor aumentó los niveles de glucógeno, $p = 0.001$, mientras que en los animales Inactivos ocurrió lo contrario, aunque no alcanzó la significación, $p = 0.084$. Por otro lado, las ratas Inactivas mantenidas a 21°C, tienen mayores reservas de glucógeno en el hígado que las ratas Activas, $p = 0.012$.

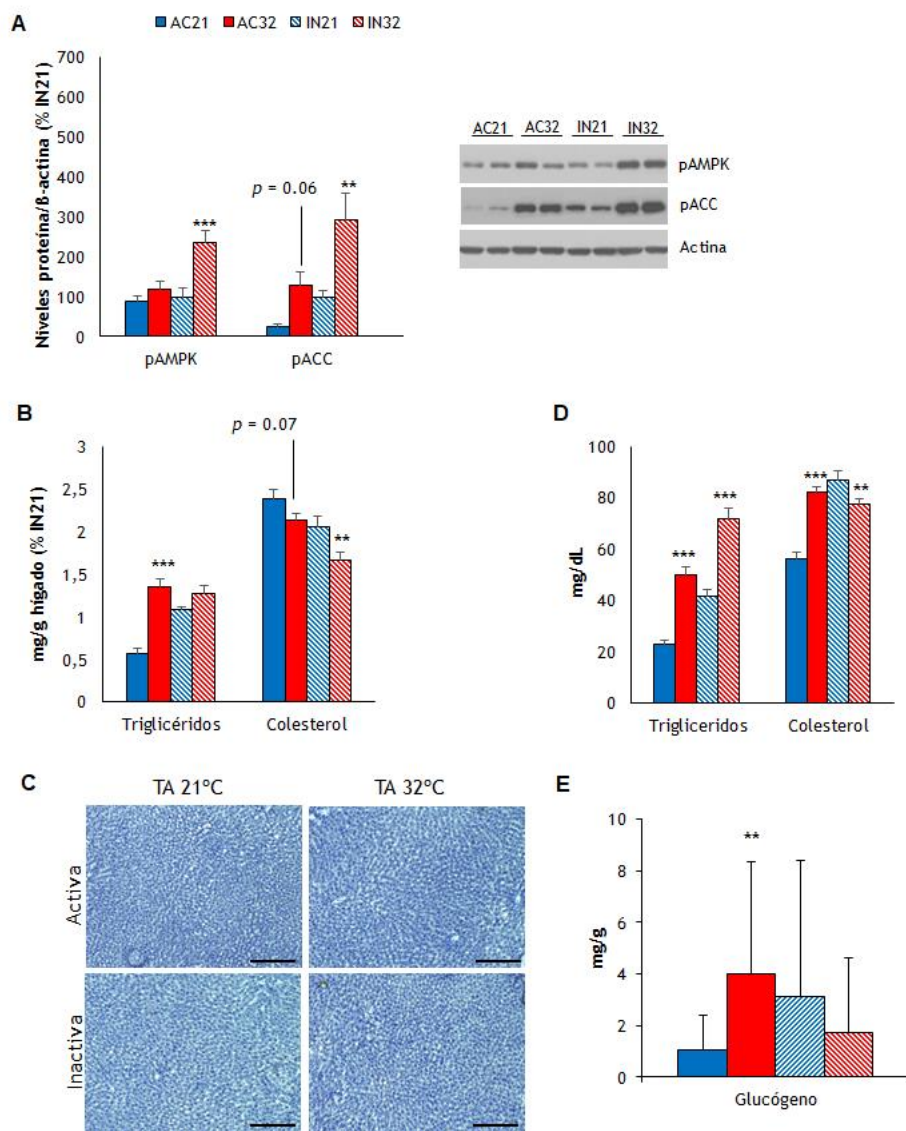


Figura 45. Niveles proteicos de la vía de AMPK en el hígado (panel izquierdo) e imágenes autorradiográficas representativas (panel derecho) (A). Niveles de triglicéridos y colesterol hepáticos (B). Secciones de hígado teñidas con Oil-Red representativas (barra de escala: 100 μm) (C). Niveles circulantes de triglicéridos y colesterol (D). Niveles de glucógeno hepático (E). Todos los datos se expresan como media ± SEM. $n = 7-11$ animales por grupo experimental

3.1.6. Estudio de marcadores de lipogénesis, lipólisis y browning en el tejido adiposo blanco

Tradicionalmente se creía que el tejido adiposo blanco únicamente ejercía las funciones de depósito de grasa para almacenar energía, aislante térmico y soporte estructural. Tras el descubrimiento en 1994 de la leptina por parte de Friedman y su equipo (Zhang et al., 1994), el tejido adiposo blanco pasó a ser reconocido como un órgano endocrino sensible a los cambios metabólicos (Blache et al., 2000; Dalamaga et al., 2013) que secreta numerosas hormonas, ejerciendo funciones autocrinas y paracrinas. Así, participa en la regulación del propio tejido y ejerce efectos sobre otros órganos como el músculo, el páncreas, el hígado y el cerebro (Baudrand, Arteaga, & Moreno, 2010; Ràfols, 2014).

Como ya hemos descrito, la anorexia nerviosa supone una gran pérdida de peso corporal y de masa grasa (Bredella et al., 2010; Grinspoon et al., 1996; Misra et al., 2003) que lleva asociada una reducción de los niveles de leptina (Bosy-Westphal et al., 2005; Föcker et al., 2011; Haas et al., 2010; Korek et al., 2013; Misra et al., 2005). En el momento de realizar la disección de los animales para extraer los tejidos destacaba que, las ratas Activas tratadas con calor presentaban mayores depósitos de grasa en comparación con las ratas mantenidas a 21°C, aunque no fue posible determinar el peso del tejido. Las diferencias entre las ratas Inactivas no fueron tan evidentes. Decidimos estudiar marcadores de lipogénesis y lipólisis, así como la posible presencia de *browning*, fenómeno que consiste en la aparición de adipocitos beige en los depósitos de tejido adiposo blanco (Kajimura, Spiegelman, & Seale, 2015; Wu et al., 2012).

3.1.6.1. El calor revierte la disminución en los marcadores de lipogénesis en WAT

En la gran mayoría de los marcadores de lipogénesis, los ANOVA Univariantes mostraron significación para el factor temperatura y actividad, indicando que la expresión de estos marcadores está disminuida en el caso de los animales a una temperatura estándar de 21°C y en animales Activos. Haciendo un análisis más pormenorizado, en la Figura 46 se puede observar que las ratas AC21 presentan una extrema disminución de los marcadores lipogénicos en comparación con las ratas Inactivas, mientras que la exposición al calor supone un aumento.

Por otro lado, en cuanto a las ratas Inactivas, la exposición al calor no produjo cambios a excepción de un aumento en FAS y SCREBP, los cuales están relacionados. Por otro lado, la lipólisis también se presentó reducida en las ratas Activas a 21°C, ya que los niveles de expresión de HSL, LPL y CPT1 β están reducidos. Nuevamente el calor revierte esta expresión, aumentándola, mientras que en las ratas Inactivas ocurre lo contrario.

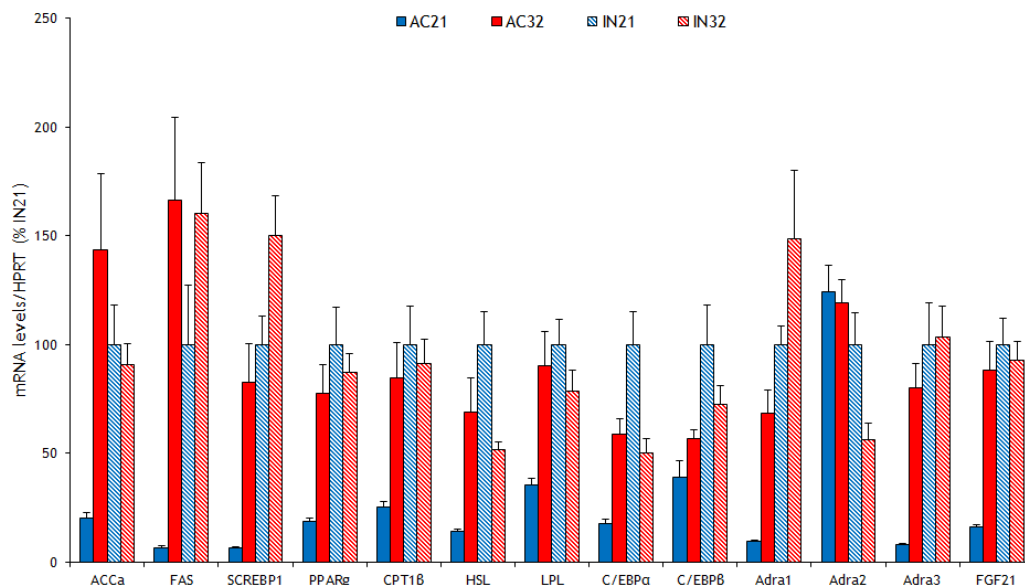


Figura 46. Cuantificación de los niveles de mRNA de marcadores de adipogénesis y lipogénesis en el tejido adiposo blanco (WAT). Todos los datos se expresan como media \pm SEM. n = 7-11 animales por grupo experimental.

3.1.6.2. Browning

El *browning* se relaciona con la elevación de marcadores termogénicos, la disminución del tamaño de los adipocitos, el aumento de la tinción de UCP1 en dichas células y de los niveles de proteína de UCP1. En la Figura 47A mostramos los resultados obtenidos en diversos marcadores de *browning* en el tejido adiposo blanco gonadal. Con respecto al principal marcador de este proceso, PRDM16, el ANOVA univariante reveló significación para ambos factores, $F(1, 25) = 6.323$; $p = 0.019$ para el factor temperatura y $F(1, 25) = 6.263$; $p = 0.019$, para el factor actividad. Esto indicó que las ratas calentadas a 32°C y las ratas Inactivas mostraron niveles más elevados. Análisis post-hoc revelaron que sólo en las ratas Activas, el aumento de la temperatura ambiente promueve el *browning*, $t(13) = -2.339$; $p = 0.036$. Estos datos se traducen en unos resultados idénticos obtenidos en la expresión proteica de UCP1 en el WAT, los cuales aparecen representados en la Figura 47B. Con respecto a PGC1 α y CIDEA, la interacción significativa para ambos marcadores (PGC1 α , $F(1, 27) = 7.199$; $p = 0.012$ y CIDEA, $F(1, 29) = 9.664$; $p = 0.004$) indicó que, mientras en las ratas Activas el calor aumenta su expresión (ambas $p < 0.05$), en las ratas Inactivas lo disminuye (ambas $p < 0.05$).

Con respecto al tamaño de los adipocitos (Figura 47C) y la inmunotinción de UCP1 (Figura 47D), únicamente el factor actividad fue significativo, $F(1, 30) = 60.536$; $p < 0.0001$ y $F(1, 28) = 61.266$; $p < 0.0001$, respectivamente. Esto indicó que los animales Inactivos poseen adipocitos más grandes y una menor tinción de UCP1 que las ratas Activas.

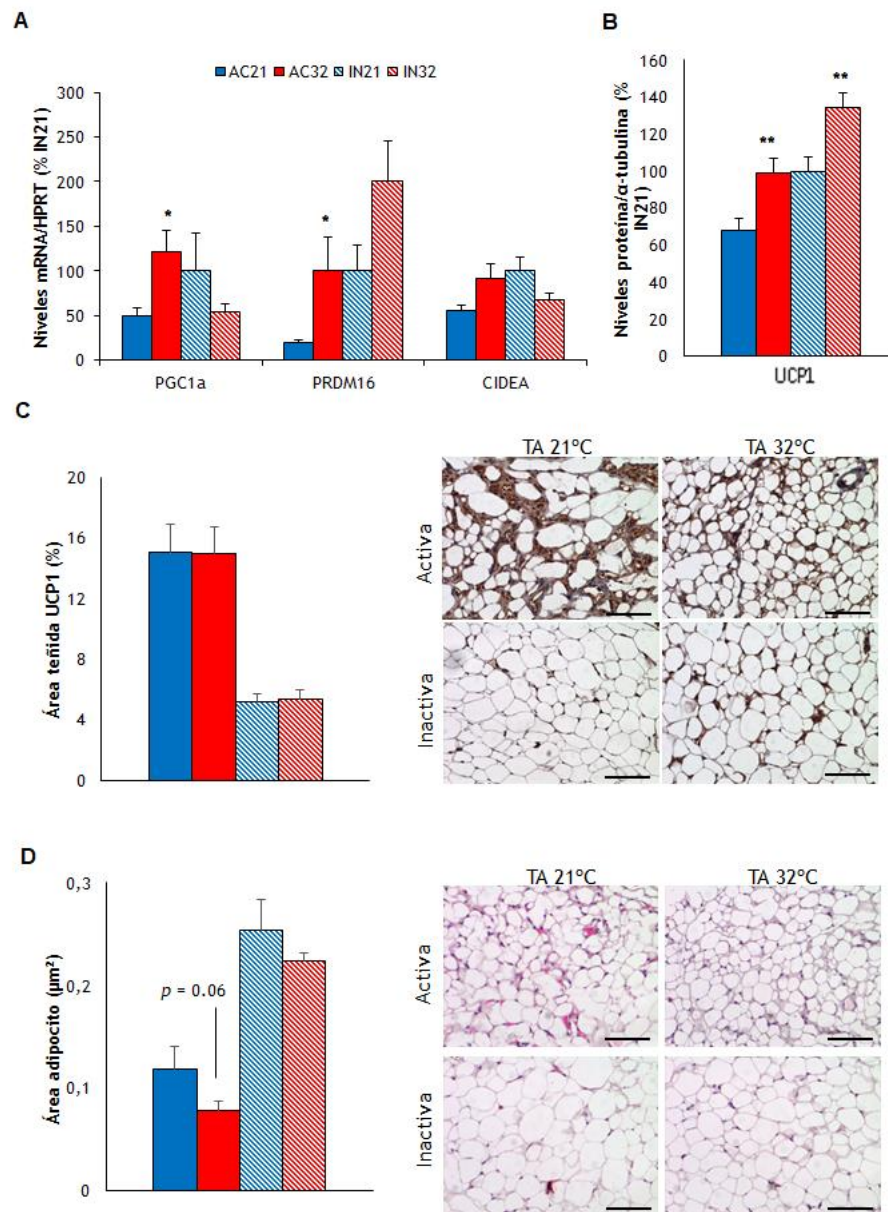


Figura 47. Niveles de mRNA de PGC1 α , PRDM16 y CIDEA (A). Niveles proteínicos de UCP1 (B). Área teñida de la inmunohistoquímica con UCP1 (panel izquierdo) e imágenes representativas (panel derecho) (C). Área del adipocito (panel izquierdo) e imágenes representativas de hematoxilina-eosina (D). Barra de escala: 100 μ m. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-11$ animales por grupo experimental

3.1.7. Estudio de marcadores de caquexia en el músculo esquelético

Las pacientes con anorexia nerviosa también presentan una reducción de la masa magra que afecta a la densidad mineral ósea y por lo tanto a otra característica común en esta enfermedad, la osteoporosis (Grinspoon et al., 2000; Singhal et al., 2014). El aumento de la masa magra se ha relacionado con una mejora de la densidad mineral ósea, por lo que se destaca la importancia de su recuperación (Sienkiewicz et al., 2011). Por lo tanto, con respecto al músculo decidimos estudiar dos marcadores de caquexia, ATROGINA1 y MURF1.

Los ANOVA Univariante realizados para ambos marcadores detectaron significación en los factores de actividad y temperatura a consecuencia de los altos niveles de las ratas Activas a 21°C (Figura 48). Por ello se decidió realizar análisis dos a dos a través de *t* Student. Así, los niveles de ambos marcadores en las ratas Activas se presentaron más elevados con respecto a sus homólogas a 32°C (ambas $p < 0.01$). Con respecto a las ratas Inactivas encontramos los mismos resultados, una reducción de los marcadores de caquexia cuando se aplica calor (ambas $p < 0.05$).

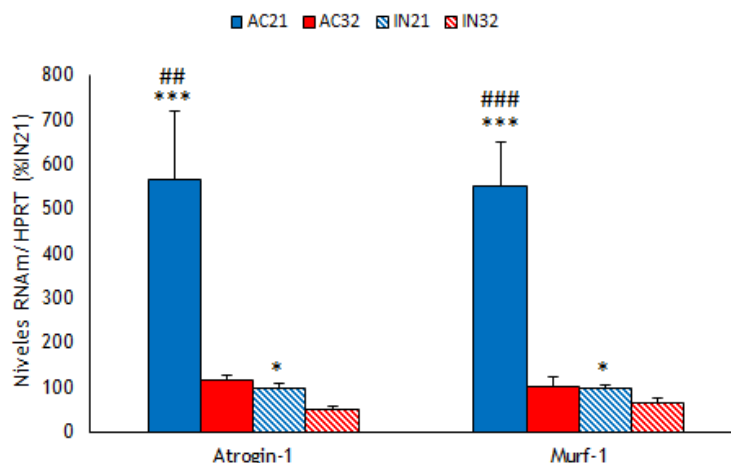


Figura 48. Niveles de mRNA de marcadores de caquexia en el músculo. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-11$ animales por grupo experimental. Abreviaturas: * AC21 vs AC32 o IN21 vs IN32; #AC21 vs IN21.

3.1.8. Estudio de diferentes metabolitos en suero

Se realizó una bioquímica completa para conocer el estado de diferentes metabolitos relacionados con la regulación metabólica que se ven representados en la Tabla 28. En cuanto a la leptina, hemos detectado que los animales Activos presentan niveles más bajos de leptina que los Inactivos, $F(1, 29) = 29.737$; $p < 0.0001$. Además, cuando a estos animales Activos se les administra calor, la pérdida de peso se reduce y en consecuencia los niveles de leptina tienden a aumentar, $p = 0.062$. Por otro lado, no se detectaron diferencias significativas entre los animales Inactivos en función de la temperatura ambiental a la que fueron expuestos, $p = 0.476$. Con respecto a la glucosa, los animales expuestos al calor presentaron niveles más elevados que los mantenidos a 21°C, $F(1, 34) = 7.178$; $p = 0.011$, aunque estas diferencias son debidas a los animales Activos, $p = 0.016$. En cuanto a los niveles de catecolaminas, tanto la noradrenalina como la adrenalina, se presentaron reducidos en las ratas Activas (noradrenalina, $F(1, 28) = 10.953$; $p = 0.003$ y adrenalina, $F(1, 28) = 4.804$; $p = 0.037$), pero no se detectaron diferencias significativas en función de la temperatura ambiental entre las ratas Inactivas o entre las ratas Activas, a excepción en estas últimas en los valores de noradrenalina ($p = 0.044$). La significación de los factores temperatura y condición de actividad detectados en el ANOVA univariante para los niveles circulantes de corticosterona, $F(1, 31) = 58.532$; $p < 0.0001$, y $F(1, 31) = 33.896$; $p < 0.0001$, respectivamente, se deben a que las ratas Activas a 21°C presentaron los niveles más elevados. De hecho, no se detectaron diferencias entre las ratas Inactivas en función de la temperatura ambiente. Por último, la exposición a una TA de 32°C

supuso un aumento de los niveles de hormonas tiroideas, T3 y T4, en las ratas Activas (ambas $p < 0.0001$) pero un descenso en ratas Inactivas, aunque sólo alcanzó la significación con respecto a los niveles de T3, $p = 0.03$.

	Activa 21°C	Activa 32°C	Inactiva 21°C	Inactiva 32°C
Leptina (ng/mL)	0.20 ± 0.002	0.24 ± 0.005*	0.28 ± 0.02#	0.29 ± 0.02
Glucosa (mg/dL)	120.33 ± 8.29	137.75 ± 3.28*	129.86 ± 5.82	140.00 ± 3.49
Corticosterona (ng/mL)	1466.87 ± 125.28***,###	273.05 ± 43.77	412.98 ± 63.40	435.91 ± 35.57
T4L (ng/dL)	0.98 ± 0.05	1.54 ± 0.07***	1.89 ± 0.07*,###	1.71 ± 0.04
T3L (pg/dL)	1.51 ± 0.09	2.24 ± 0.05***	3.68 ± 0.05***,###	3.07 ± 0.09
Adrenalina (ng/mL)	2.46 ± 0.50	2.15 ± 0.19	4.17 ± 1.21	3.43 ± 0.77
Noradrenalina (ng/mL)	2.64 ± 0.32*	1.75 ± 0.17	3.54 ± 0.58	3.58 ± 0.58

Tabla 30. Parámetros metabólicos séricos. $n = 9-11$ animales por grupo experimental. *Diferencias significativas entre Activa 21°C y Activa 32°C o Inactiva 21°C e Inactiva 32°C. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, y *** $p < 0.001$. #Diferencias significativas entre Activa 21°C e Inactiva 21°C. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ y ### $p < 0.001$.

3.1.9. Estudio de otras rutas implicadas en la regulación del metabolismo energético: ER STRESS (VMH), ruta de mTOR (ARC) y marcadores de inflamación hipotalámico (VMH)

Además de la vía de señalización de AMPK en el VMH y el ARC, estudiamos otras vías en ambos núcleos hipotalámicos. En el núcleo ventromedial se estudió la vía UPR, cuya activación produce ER STRESS y en consecuencia aumenta el peso corporal y reduce la termogénesis (Contreras et al., 2014), y marcadores de inflamación, los cuales también pueden perjudicar el control hipotalámico del balance energético (Le Thuc et al., 2017). Por otro lado, en el núcleo arcuato se estudió la vía de mTOR, la cual regula la ingesta en el arcuato en una dirección opuesta a la de AMPK, por lo que se activa con la ingesta (Cota et al., 2006).

Con respecto al ER STRESS, se analizaron tres de los efectores más importantes de la vía de señalización, GRP78 (también denominado BIP), CHOP y pPERK, en el núcleo ventromedial (Figura 49A), pero no se encontraron diferencias significativas.

En relación con los marcadores de inflamación, se han estudiado tres: pIKK, IL6 y IL1 β (Figura 49B). Tampoco se encontraron diferencias significativas en estos marcadores a excepción de una mayor activación en las ratas Activas a 21°C, con respecto a los demás grupos (todas las $p < 0.05$) en IL6, y una reducción en las ratas Inactivas calentadas a 32°C respecto a las mantenidas a 21°C, $p = 0.004$ en IL1 β .

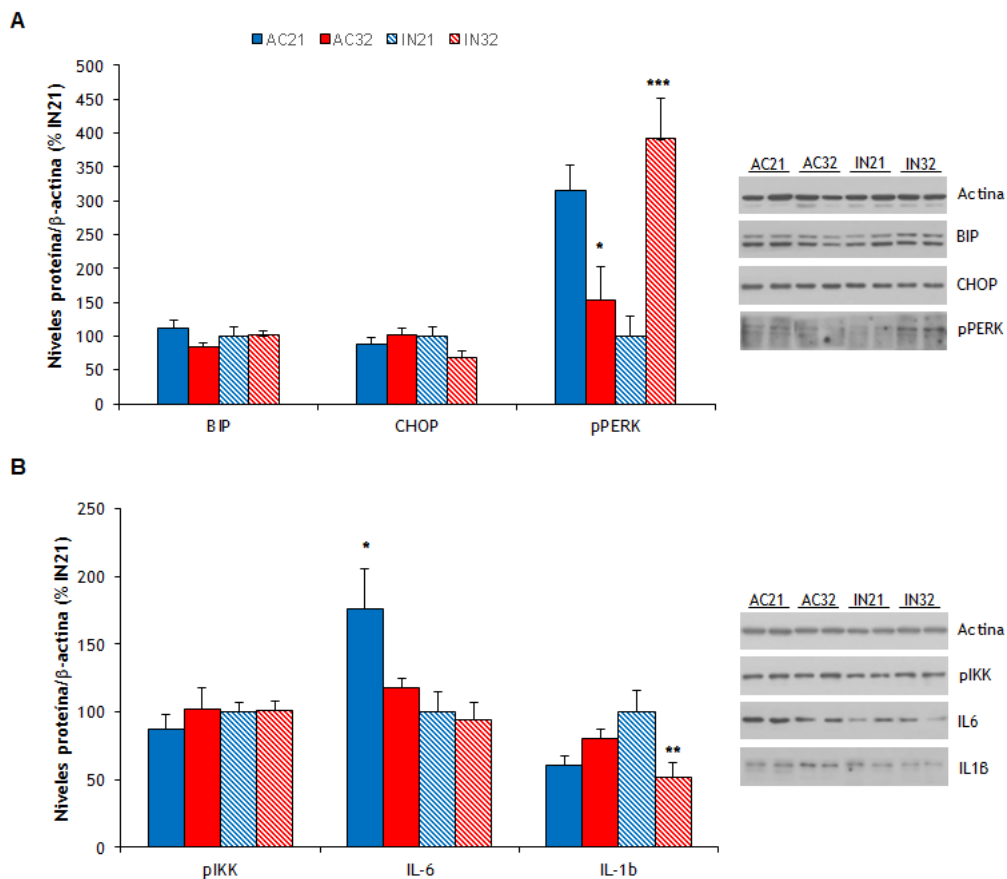


Figura 49. Niveles proteicos de la vía UPR en el núcleo ventromedial (A), y niveles de proteínas de marcadores de inflamación en el núcleo ventromedial. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-8$ animales por grupo experimental.

Por último, en la Figura 50 se puede observar la vía de señalización de mTOR, en la cual no hay cambios significativos en ningún enzima de la vía. Si bien parece que, entre los animales Activos, las ratas calentadas a 32°C aumentaron los niveles en las dianas final S6 y pS6 (ambas $p = 0.002$), y disminuyeron en pS6K1 ($p = 0.002$).

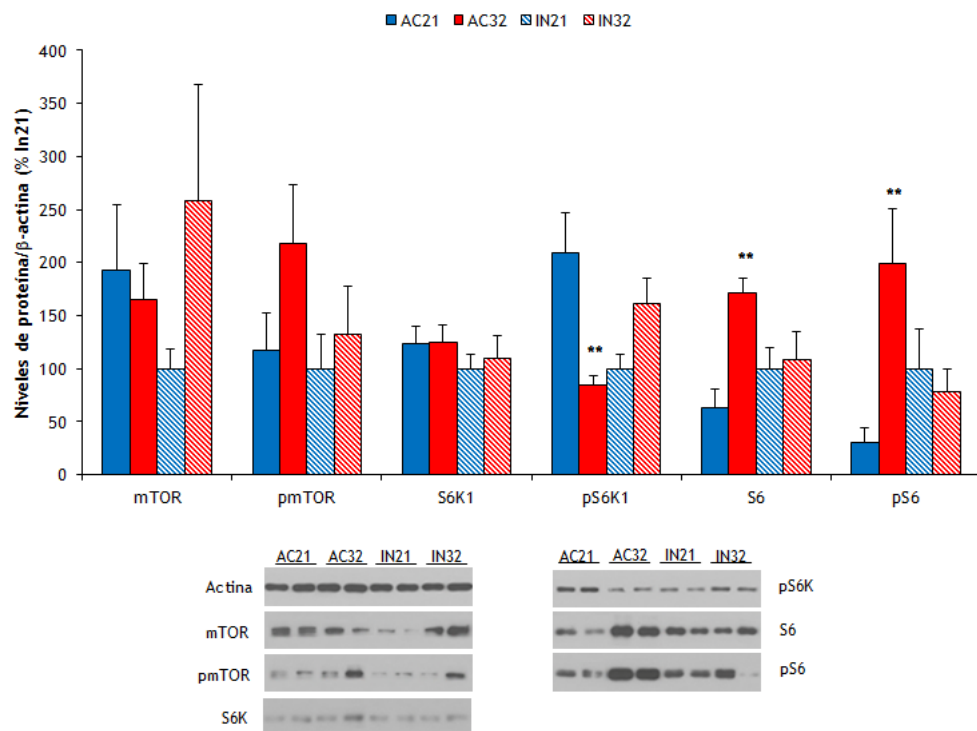


Figura 50. Niveles proteicos de la vía de mTOR en el núcleo arcuato (panel superior) e imágenes autorradiográficas representativas (panel inferior). Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-8$ animales por grupo experimental

3.2. ESTUDIO DE LA TERMOGÉNESIS ADAPTATIVA Y LA IMPLICACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE AMPK EN EL MODELO ABA EN COMPARACIÓN CON UN GRUPO ACTIVO AD LIBITUM

Los resultados hasta ahora expuestos deben ser tomados con cautela pues solo podemos hacer una serie de análisis: por un lado, observamos cómo afecta la hiperactividad a una situación de restricción de alimento con la comparación de los grupos AC21 e IN21, y por otro lado qué cambios produce la exposición a un ambiente cálido tanto cuando un animal está expuesto únicamente a restricción de alimento (IN21 vs IN32) como cuando además ha atravesado por una situación de actividad excesiva (AC21 vs AC32). En cualquier caso, se trata de una situación de balance energético negativo ya que todos los animales están perdiendo peso, especialmente en las ratas Activas en el que el peso, al final de experimento es de un 70% con respecto al inicio. Aunque el calor permite que la pérdida de peso sea menos pronunciada, cuando se cumple el criterio de recuperación (peso en el día n superior al día $n-4$) para los animales Activos, estos todavía permanecen por debajo del umbral del criterio de pérdida de peso del 20%. En cuanto a los animales Inactivos, en ambas condiciones de temperatura ambiente, está demostrado que son capaces de adaptarse a la restricción de alimento y en consecuencia aumentar el peso corporal, pero para ello son necesarios más días de los que hemos permitido en nuestro experimento (Cerrato et al., 2012), ya que el objetivo era que los animales Activos e Inactivos permaneciesen en restricción de alimento un tiempo similar. Así, los animales Inactivos de este estudio aún no han logrado adaptarse y todavía pierden peso.

Ante esta situación, la interpretación de los resultados obtenidos demanda un grupo control metabólicamente saludable y, teniendo en cuenta la teoría termorreguladora de la

hiperactividad, en el que no hay un proceso de hipotermia presente. Esto permitiría en primer lugar, caracterizar el estado metabólico de una rata ABA, y en segundo, una interpretación más certera del efecto del aumento de la temperatura ambiente. Por ello se decidió estudiar un grupo Activo con alimentación ad libitum que nos permite obtener, sin eliminar el factor actividad imprescindible del modelo ABA, un patrón metabólicamente sano ya que la rata puede regular la ingesta de alimentos en relación con las demandas energéticas que genera una rueda de actividad (Lattanzio & Eikelboom, 2003).

3.2.1. Procedimiento ABA

La Figura 51A muestra la actividad en la rueda de los animales durante la primera fase. Todas las ratas aumentan la carrera con el paso de los días, $F(1.9, 53.0) = 37.158$; $p < 0.0001$, aunque las ratas en restricción de alimento lo hacen de manera más pronunciada que las ratas con alimento ad libitum, $F(3.9, 53.0) = 7.238$; $p < 0.0001$, dando lugar a diferencias significativas entre los grupos, $F(2, 27) = 8.938$; $p = 0.001$. Así, no existen diferencias significativas entre las ratas a restricción de alimento en función de la asignación a una u otra temperatura en la segunda fase, $p = 0.273$, pero sí con las ratas ad libitum ya que corren 3 veces más (ambas $p < 0.05$).

Con respecto al peso corporal, la Figura 51B muestra la evolución de los cinco grupos experimentales durante la Fase I. Un ANOVA de una vía reveló que existían diferencias significativas en el peso corporal en el momento de comenzar el experimento (Día 0), $F(4, 46) = 2.803$; $p = 0.04$, aunque estas solo se debían con respecto al grupo Activo en restricción de alimento a 21°C, cuyo peso inicial era menor. El ANOVA de medidas repetidas realizado con un único factor Grupo, reveló una interacción significativa, $F(1.4, 60.2) = 92.302$; $p < 0.0001$, lo que indicó que los grupos a restricción de alimento perdían peso mientras que el grupo ad libitum lo aumentaba. También se mostró un efecto principal significativo, $F(4, 42) = 237.695$; $p < 0.0001$, cuyo post hoc mostraron que el grupo ad libitum tiene más peso que cualquier grupo en restricción de alimento (todas las $p < 0.0001$). Por otro lado, no existen diferencias significativas entre los demás grupos. Teniendo en cuenta solo el factor Grupo perdemos información con respecto a la influencia que podría tener la condición de actividad, es decir, que una rata tenga acceso de actividad o no, y si existen diferencias entre grupos que posteriormente fueron asignados a 21°C o 32°C. Por lo tanto, se realizó un ANOVA de medidas repetidas con un factor actividad (Activa vs Inactiva) y otro factor temperatura (21°C vs 32°C) para los grupos experimentales sometidos a restricción de alimento, y dar más luz a los actuales resultados. Al igual que en el Estudio 1, se detectó un efecto principal para el factor actividad, $F(1, 31) = 8.368$; $p = 0.007$, lo que indicó que las ratas Inactivas pierden menos peso que las ratas Activas, pero no se encontraron diferencias significativas con respecto al factor temperatura, $F(1, 31) = 1.063$; $p = 0.311$. En el momento en el que hubo que asignar los animales a una u otra condición de TA, el peso corporal de las ratas ad libitum era superior al de las ratas a restricción de alimento (todas las $p < 0.0001$), pero no hubo diferencias en función de la TA entre los grupos Activos, $p = 0.624$, o entre los grupos Inactivos a restricción de alimento, $p = 0.903$.

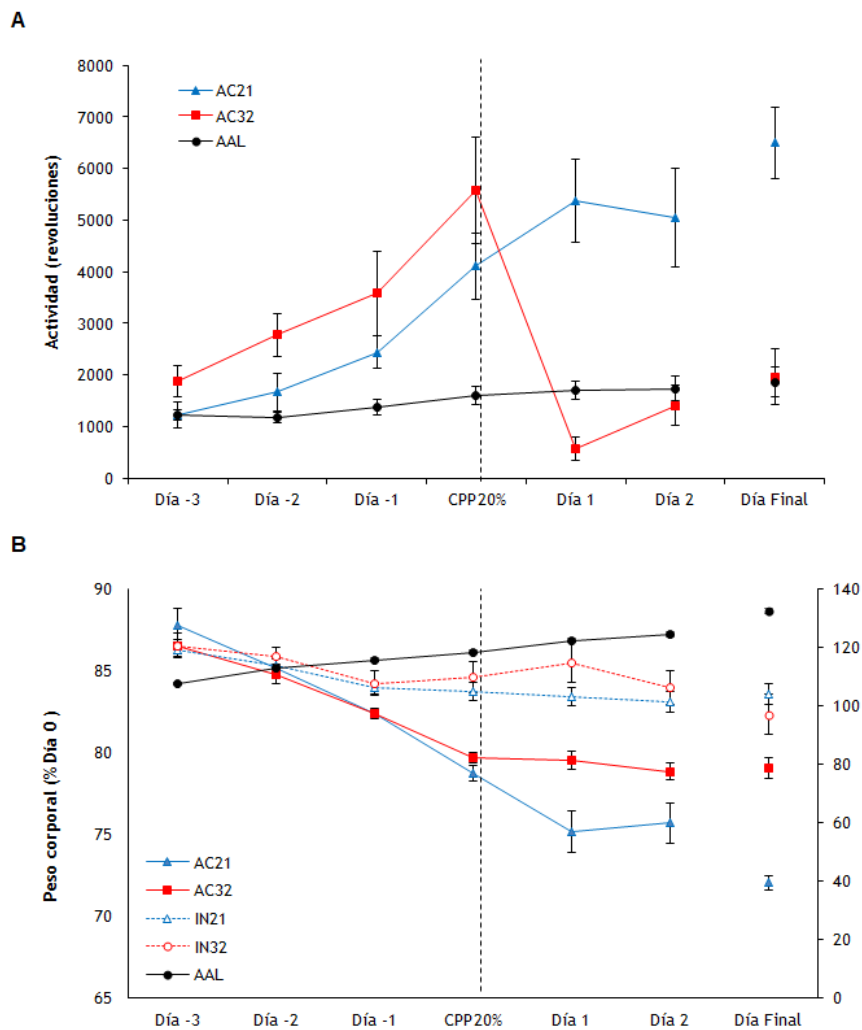


Figura 51. Actividad diaria en la rueda (A) y peso corporal relativo al peso en el Día 0 (B) durante los días previos y posteriores a alcanzar el CPP20%, y el Día Final para el Estudio 2. La línea vertical punteada indica el momento en el que se elevó la temperatura ambiente a 32°C para los grupos AC32 e IN32. Todos los datos se expresan como media \pm SEM.

La Figura 52A hace referencia a la temperatura corporal. El ANOVA de medidas repetidas con un único factor Grupo mostró que, durante la Fase I, la temperatura corporal descende en todos los grupos experimentales, $F(2.4, 99.0) = 25.278$; $p < 0.0001$, aunque de manera más pronunciada para los grupos en restricción de alimento, $F(9.9, 99.0) = 1.937$; $p = 0.04$. Esto da lugar a un efecto principal significativo, $F(4, 40) = 9.622$; $p < 0.0001$, cuyo post hoc reveló que las ratas ad libitum tienen una mayor temperatura que los animales a restricción (todas las $p < 0.05$), excepto con respecto al grupo AC32 que no alcanza la significación, $p = 0.060$. De nuevo, realizamos un ANOVA de medidas repetidas 2x2, para los grupos a restricción, lo que nos indicó que las ratas Activas tienen una mayor temperatura corporal en la Fase I que las ratas Inactivas, $F(1, 30) = 8.070$; $p = 0.008$.

La Figura 52B representa la ingesta. Como ya hemos descrito en el primer estudio, debido a que el cambio de la TA se hace después de la rutina de pesaje y antes de dar la comida, la primera fase para la ingesta comprende los tres primeros días (excluyendo el Día CPP20%).

Por la propia naturaleza del experimento, era de esperar que las ratas ad libitum hayan comido más que las ratas a restricción, pues tienen más tiempo disponible el alimento. Aunque durante el periodo de comida de hora y media, las ratas a restricción, disponen de una cantidad de alimento suficiente para alcanzar lo que consumen las ratas ad libitum, y a pesar de que aumentaron la ingesta con el paso de los días mientras que las ratas ad libitum mostraron una ingesta estable, $F(7.0, 73.9) = 2.158$; $p = 0.05$, su consumo está muy por debajo (todas las $p < 0.0001$). Además, el ANOVA de medidas repetidas 2x2 para los grupos a restricción indicó que las ratas Inactivas comen más que las ratas Activas, $F(1, 31) = 7.680$; $p = 0.009$.

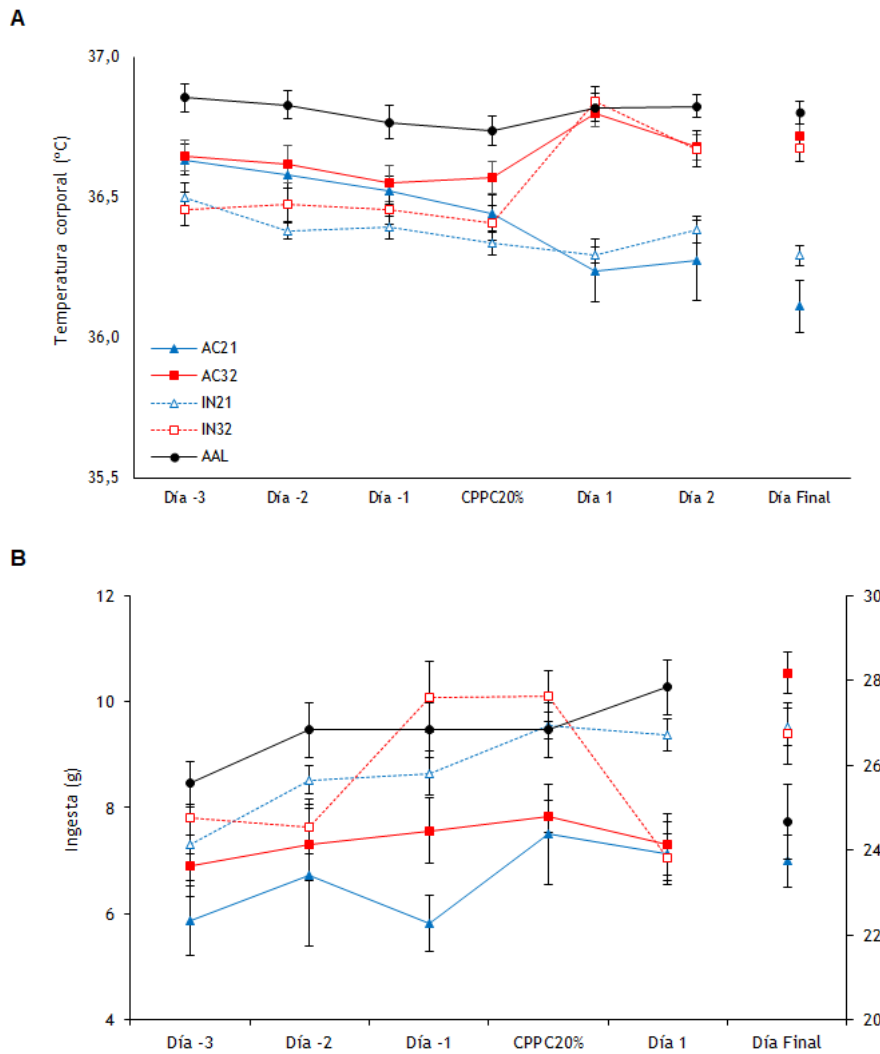


Figura 52. Temperatura corporal (A) e ingesta diaria (B) durante los días previos y posteriores a alcanzar el CPP20%, y el Día Final para el Estudio 2. La línea vertical punteada indica el momento en el que se elevó la temperatura ambiente a 32°C para los grupos AC32 e IN32. Sólo se muestran seis puntos en el eje de abscisas para la ingesta ya que el experimento se terminó después de haber registrado el peso y antes de registrar la ingesta. Todos los datos se expresan como media \pm SEM.

La segunda fase comenzó una vez que los animales Activos alcanzaron el CPP20% y fueron asignados a una temperatura ambiente estándar de 21°C o a una temperatura elevada de 32°C.

Esta segunda fase duró, en el caso de los animales Activos, hasta que los animales alcanzaron el criterio de retirada o el de recuperación. Asimismo, los animales Inactivos fueron asignados a una u otra temperatura ambiental en función de la mediana de días que tardaron las ratas activas en alcanzar el criterio de CPP20%. Del mismo modo, fueron retiradas del experimento una vez transcurridos la mediana de días que tardan los animales Activos en alcanzar el criterio de retirada, para los animales a temperatura ambiente estándar de 21°C, o el criterio de recuperación para los animales a temperatura elevada de 32°C.

Durante esta segunda fase, las ratas desarrollan un patrón de actividad diferente en función del grupo al que pertenecen, $F(2, 46) = 4.482$; $p = 0.004$. Como era de esperar, mientras que las ratas con restricción de alimento mantenidas a 21°C continúan aumentando la carrera con respecto a la Fase I, pasando de una media de 4.106,78 vueltas en el día CPP20% a 6.499,33 en el Día Final, las ratas calentadas a 32°C la disminuyen, pasando de una media de 5.574 vueltas en el Día CPP20% a 1.962,33 en el Día Final (Figura 51A). Por otro lado, las ratas ad libitum mantienen estable el nivel de actividad, con un aumento medio de 270 vueltas desde el día CPP20% hasta el Día Final. Esto se traduce en un efecto principal para la Fase II, $F(2, 23) = 25.578$; $p < 0.0001$, lo que indicó que las ratas mantenidas a una temperatura ambiente de 21°C corrieron más que las ratas calentadas a 32°C, $p = 0.006$, y que las ratas ad libitum, $p < 0.0001$. Además, las ratas a 32°C redujeron su actividad a los mismos niveles que las ratas ad libitum, $p = 0.545$.

Respecto al peso corporal, como era de esperar, las ratas a restricción de alimento continuaron perdiendo peso, mientras que las ratas ad libitum lo aumentaron, tal y como mostró la interacción significativa, $F(2, 76) = 79.211$; $p < 0.0001$ (Figura 51B). El post hoc del efecto principal significativo, $F(4, 38) = 375.340$; $p < 0.0001$, reveló que las ratas ad libitum tienen un peso superior que cualquier grupo a restricción de alimento (todas las $p < 0.0001$). Al igual que la Fase I, para conocer mejor la evolución del peso corporal de los animales a restricción en función de su condición de actividad y temperatura ambiente, se realizó un ANOVA de medidas repetidas con estos dos factores para los grupos a restricción de alimento. Este mostró una interacción significativa para la combinación de ambos factores, $F(2, 54) = 20.725$; $p < 0.0001$, pero no un efecto principal, $F(1, 27) = 1.339$; $p = 0.257$, lo que indicó que, aunque la combinación de factores produce una pérdida de peso más rápida, esta no alcanzó diferencias significativas. Por otro lado, aunque no se encontró interacción significativa para cada factor por separado, sí se detectó efecto principal significativo para cada uno de ellos, $F(1, 27) = 4.179$; $p = 0.05$ para el factor temperatura y $F(1, 27) = 34.131$; $p < 0.0001$ para el factor actividad. Esto mostró que las ratas mantenidas a 21°C pierden más peso que las ratas a 32°C, y que las ratas Activas también pierden más peso que las ratas Inactivas.

Cómo se puede ver en la Figura 52A, mientras la temperatura corporal de las ratas calentadas a 32°C aumenta con respecto a la Fase I, la temperatura corporal de las ratas mantenidas a 21°C disminuye, y la de las ratas ad libitum deja de descender y se mantiene estable. El ANOVA de medidas repetidas para el factor Grupo indicó una interacción significativa, $F(6.7, 60.5) = 4.276$; $p = 0.001$, y un efecto principal, $F(4, 36) = 23.507$; $p < 0.0001$. El análisis post hoc reveló que las ratas ad libitum mantienen una temperatura corporal más elevada que las ratas mantenidas a 21°C independientemente de si son Activas o Inactivas (ambas $p < 0.001$). Por el contrario, como las ratas calentadas a 32°C aumentaron su temperatura corporal, estas se igualaron a la de las ratas ad libitum, por lo que entre ellas no se encontraron diferencias significativas, ambas $p > 0.05$. El ANOVA de medidas repetidas 2x2 para los grupos de restricción nos informó de que fue el factor temperatura y no el factor actividad el que da

lugar a las diferencias en la temperatura corporal de estas ratas en la segunda fase, tal y como mostró el efecto principal significativo para el factor TA, $F(1, 26) = 64.547$; $p < 0.0001$.

La segunda fase de la ingesta comprende desde el Día CPP20% hasta el Día Final, tal y como ya se explicó en el primer estudio. En la Figura 52B se observa que las ratas ad libitum registraron una ingesta superior a los grupos a restricción, $F(4, 38) = 300.074$; $p < 0.0001$, aún a pesar de haber sufrido una bajada en el Día Final. El ANOVA de medidas repetidas 2x2 para los grupos a restricción informó de un efecto principal para el factor actividad, $F(1, 27) = 5.538$; $p = 0.026$, indicando que las ratas Inactivas continuaron con una ingesta superior que las Activas. También reveló una interacción significativa para el factor temperatura, $F(2, 54) = 7.528$; $p = 0.001$, por lo que las ratas calentadas a 32°C aumentaron su ingesta, pero el efecto principal no fue significativo, probablemente porque las ratas Inactivas a 21°C tienen una ingesta similar a los dos grupos calentados. Nuevamente, realizamos un análisis de la ingesta para los dos últimos días antes de que los animales finalizaran el experimento, siendo las medias y el SEM los que se muestran a continuación: AAL, 55.08 ± 1.27 g; AC21, 13.20 ± 0.35 g; AC32, 19.74 ± 0.26 g; IN21, 18.90 ± 0.54 g; IN32, 18.46 ± 0.31 g. Así, los animales Activos expuestos a 32°C comieron casi 7 gramos más que los animales mantenidos a 21°C, $p = 0.003$, mientras que no se detectaron diferencias significativas entre los animales Inactivos, $p = 0.999$.

3.2.2. Comparación metabólica de una rata activa con alimentación ad libitum y una rata inactiva con restricción de alimento

Para comprender mejor qué ocurre metabólicamente con los animales expuestos a ABA, y para arrojar un poco más de luz a los resultados obtenidos anteriormente con respecto a la implicación de la vía de señalización de AMPK en los resultados termogénicos, se decidió hacer una comparación dos a dos. Así, analizaremos desde un animal que no es expuesto al procedimiento ABA con otro expuesto a ABA, incluyendo la comparación con un animal expuesto a ABA en vía de recuperación por medio de la exposición a una temperatura ambiental de 32°C. Aunque en las siguientes gráficas se representan aquellos grupos que nos interesa comparar en cada momento, las técnicas moleculares se realizaron con el total de los cinco grupos, tomando como grupo control las ratas Activas con alimentación ad libitum (AAL). Por ello, en aquellos casos en los que no se compare directamente con este grupo control, se incluirá una línea de puntos que representa sus valores.

Empezaremos haciendo una comparación entre animales expuestos por separado a dos condiciones que no entrañan consecuencias negativas para los animales, sino todo lo contrario: ratas AAL y ratas Inactivas con restricción de alimento (IN21). Ambos grupos pueden considerarse que representan condiciones saludables, ya que es bien sabido que tanto el ejercicio como la restricción calórica, de forma independiente, son beneficiosos para la salud. El ejercicio mejora la resistencia a la insulina, aumenta la masa ósea, ayuda a mantener el peso corporal, etc. (Andersen, Crespo, Bartlett, Cheskin, & Pratt, 1998; Helmrich, Ragland, Leung, & Paffenbarger, 1991; Mayer-Davis et al., 1998), mientras que la restricción calórica retrasa el envejecimiento, reduce el colesterol, reduce la glucosa en el ayuno y la presión sanguínea, etc. (Gredilla & Barja, 2005; Mercken, Carboneau, Krzysik-Walker, & de Cabo, 2012).

Las ratas Inactivas con restricción de alimento presentaron al final de experimento un menor peso y una menor temperatura corporal, además de una obvia menor ingesta de comida. En relación con la menor temperatura corporal presentada por las ratas IN21, esta presentó una menor expresión de UCP1 y una menor temperatura en la piel del área del BAT. Por el contrario,

estos resultados no se correlacionan con la mayor activación presentada de los receptores beta 3-adrenérgicos (Figura 53A-B).

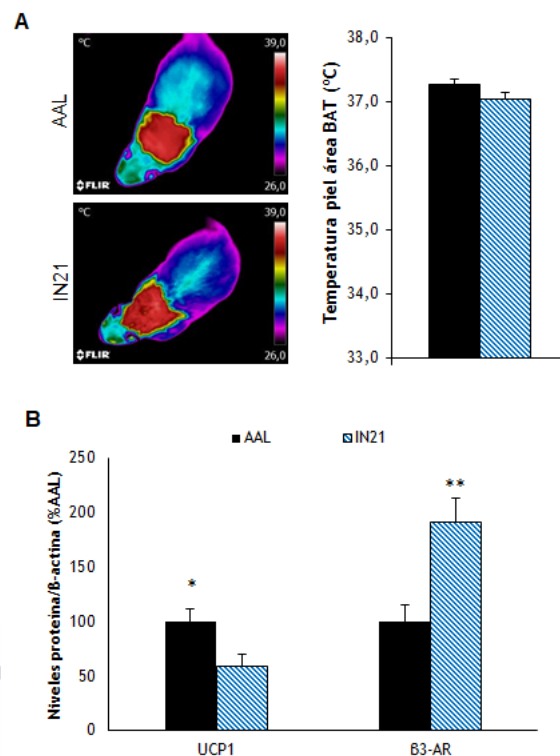


Figura 53. Imágenes térmicas representativas (panel izquierdo) y temperatura de la piel del área del BAT (A), niveles de UCP1 y receptor β 3-adrenérgico (B). Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-11$ animales por grupo experimental. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Con respecto a la vía de señalización de AMPK en el núcleo ventromedial del hipotálamo, en la Figura 54A se puede observar que a pesar de no detectarse diferencias en la fosforilación de AMPK, $t(16) = 1.107$; $p = 0.285$, sí se detectó una reducción en ACC y su forma fosforilada (ambas $p < 0.01$) en las ratas IN21, sugiriendo una activación de la síntesis de lípidos.

En la Figura 54B se muestran los niveles proteicos de enzimas implicados en la vía de AMPK en el hígado. Al contrario que en el núcleo ventromedial, la disminución en los niveles de pACC en las ratas IN21 fueron acompañados también de una reducción en pAMPK (ambas $p < 0.0001$), sugiriendo un incremento de la lipogénesis *de novo* en tejido periférico. Si bien un aumento en las enzimas pAMPK y pACC deberían producir una disminución de los niveles de FAS, se detectó lo contrario ($p = 0.05$). Estos datos insinúan la puesta en marcha de la oxidación de lípidos y aunque la enzima encargada de introducir los ácidos grasos en la mitocondria para que la β -oxidación ocurra, CPT1 α , tiende a estar más activada, no se detectaron diferencias significativas, $t(16) = 1.457$; $p = 0.165$.

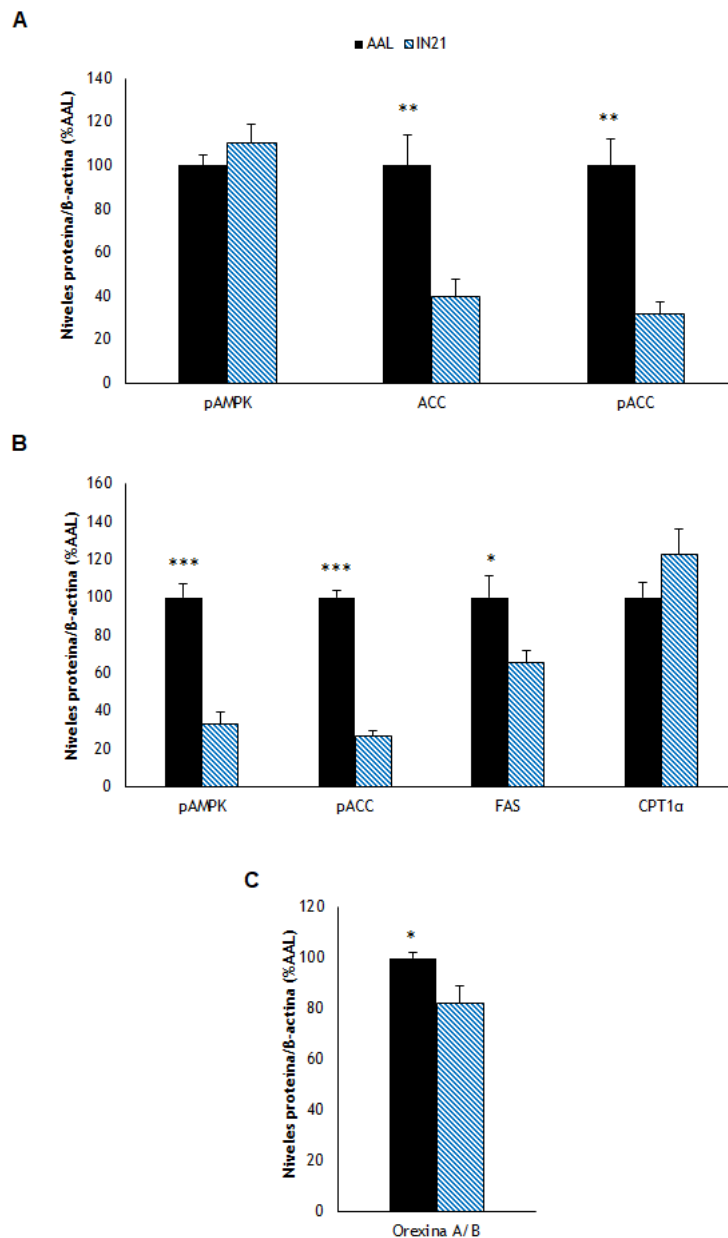


Figura 54. Niveles de proteína de la ruta de AMPK en el núcleo ventromedial (A), niveles de proteína de la ruta de AMPK en el hígado (B) y niveles de orexinas en el área lateral hipotalámica (C). Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-8$ animales por grupo experimental. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Por último, se han analizado los niveles de orexina en el área lateral del hipotálamo, encontrando una reducción en las ratas IN21, $t(14) = -2.511$; $p = 0.025$ (Figura 54C).

3.2.3. ¿Qué ocurre cuando a una rata con restricción calórica es expuesta a un ambiente cálido?

A continuación, se comparó el grupo saludable IN21 con un grupo con las mismas condiciones de inactividad y restricción de alimento pero que es expuesto a un ambiente cálido

de 32°C. Estos grupos únicamente se diferenciaron en la temperatura corporal, siendo más elevada en el grupo de ratas expuestas a calor, por lo tanto, presentaron el mismo peso corporal y la misma ingesta.

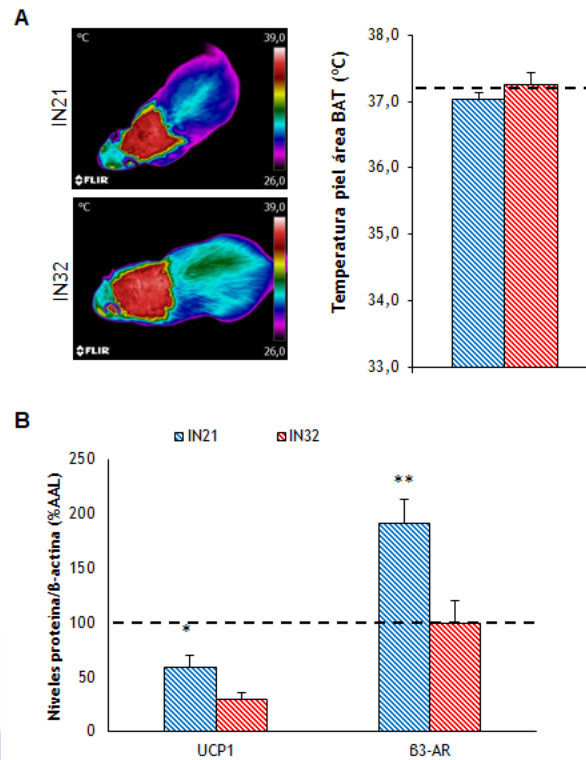


Figura 55. Imágenes térmicas representativas (panel izquierdo) y temperatura de la piel del área del BAT (A), niveles de UCP1 y receptor B3-adrenérgico (B). Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-11$ animales por grupo experimental. La línea discontinua hace referencia a los valores del grupo control AAL que representa el 100%. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Las ratas expuestas a calor mostraron una disminución de los niveles proteicos de UCP1, $p = 0.03$, y de los receptores beta3-adrenérgicos, $p = 0.008$, en el BAT (Figura 55A), pero no se detectaron diferencias significativas en la temperatura de la piel del área del BAT, $p = 0.309$ (Figura 55B).

En la Figura 56A se representan los niveles proteicos de enzimas de la ruta de AMPK en el núcleo ventromedial del hipotálamo. En las ratas IN32, a pesar de no existir diferencias significativas en los niveles de pAMPK y ACC (ambas $p > 0.05$), se detectó una disminución de pACC, $p = 0.001$, lo que sugiere que la exposición a un ambiente cálido aumenta la síntesis de lípidos hipotalámica en el núcleo ventromedial.

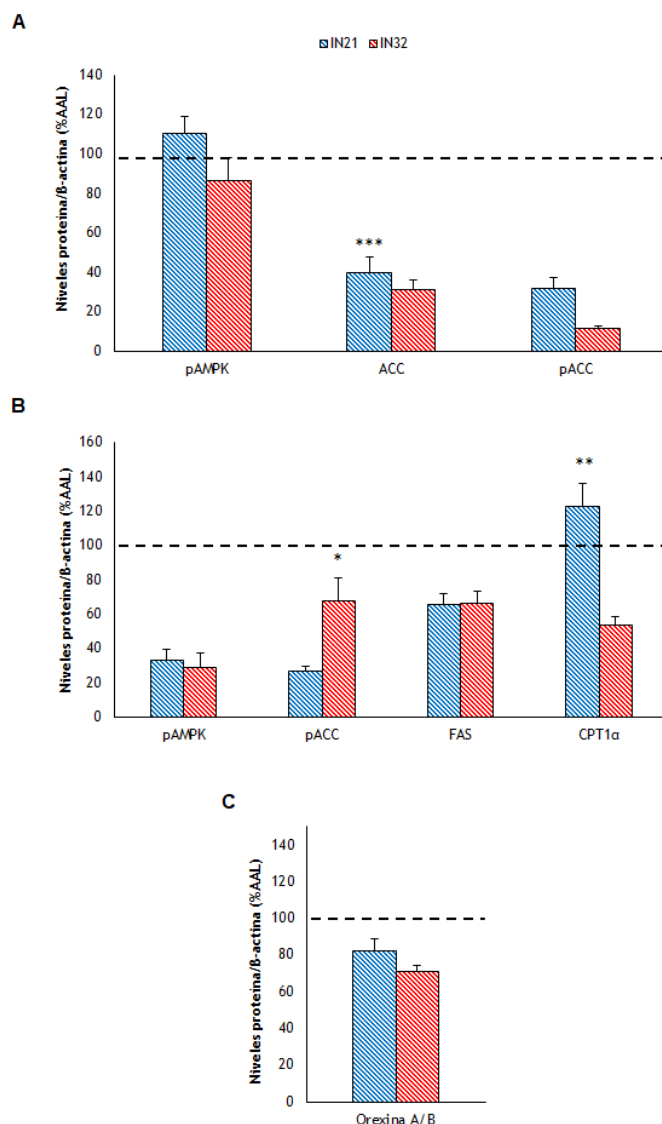


Figura 56. Niveles de proteína de la ruta de AMPK en el núcleo ventromedial (A), niveles de proteína de la ruta de AMPK en el hígado (B) y niveles de orexinas en el área lateral hipotalámica (C). Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-8$ animales por grupo experimental. La línea discontinua hace referencia a los valores del grupo control AAL que representa el 100%. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

En el hígado, al contrario de lo que ocurre en el ventromedial, la síntesis de lípidos parece estar reducida debido a los altos niveles de pACC, $p = 0.024$, aunque no se detectaron cambios en pAMPK, $p = 0.729$. Si bien tampoco se detectaron diferencias significativas en FAS, $p = 0.597$. Por otro lado, se detectó una gran reducción de CPT1 α , $p = 0.004$, lo que indica la inhibición de la oxidación de los lípidos (Figura 56B).

En cuanto a los niveles de orexinas en el área lateral del hipotálamo representado en la Figura 56C, las ratas calentadas tienden a reducir sus niveles, aunque no se alcanzó la significación estadística, $t(13) = 1.480$; $p = 0.163$.

3.2.4. Comparación metabólica de ratas expuestas al procedimiento ABA con respecto animales expuestos bien a restricción de alimento o bien con acceso a rueda de actividad

El siguiente paso fue comparar las ratas expuestas a condiciones saludables (AAL e IN21) con animales que han desarrollado las consecuencias del modelo ABA: hiperactividad, pérdida de peso, disminución de la ingesta e hipotermia (AC21).

En primer lugar, compararemos las ratas AC21 con las IN21 para estudiar el efecto de la actividad, ya que un grupo tiene acceso a la rueda de actividad y el otro no a la vez que se les restringió el alimento. Esto dio como resultado que las ratas AC21 perdieron más peso, comieron menos y presentaron una menor temperatura corporal. A pesar de la menor temperatura corporal y menor temperatura en la piel del área del BAT, $t(14) = 11.183$; $p < 0.0001$, no se detectaron diferencias significativas en los niveles de UCP1 o de los receptores beta3-adrenérgicos (ambas $p > 0.05$), tal y como se puede observar en la Figura 57.

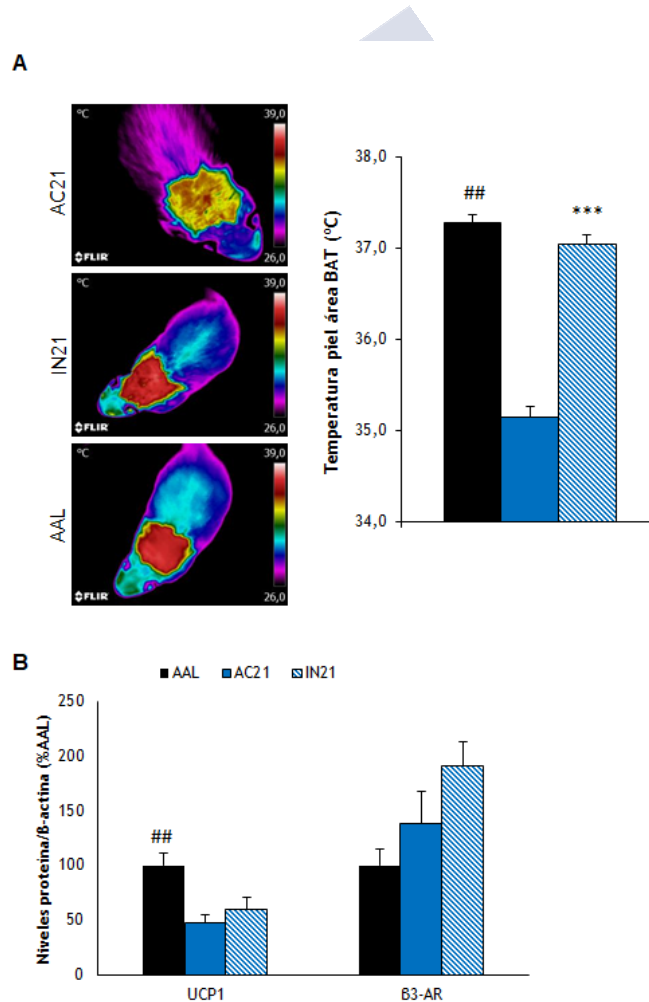


Figura 57. Imágenes térmicas representativas (panel izquierdo) y temperatura de la piel del área del BAT (A), niveles de UCP1 y receptor beta3-adrenérgico (B). Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-11$ animales por grupo experimental. *AC21 vs IN21: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. AC21 vs AAL: # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ y ### $p < 0.001$.

En el núcleo ventromedial (Figura 58A), los niveles de pACC mostraron una tendencia a aumentar, $t(14) = -1.993$; $p = 0.06$, sin cambios en los enzimas pAMPK y ACC (ambas $p < 0.05$), lo que sugiere una disminución de la síntesis de lípidos en esta área del hipotálamo.

Con respecto al hígado, en la Figura 58B se puede observar una reducción de los enzimas de la vía para la síntesis de lípidos, pAMPK y pACC, aunque el primero solo mostró tendencia ($p = 0.09$ y $p < 0.0001$, respectivamente).

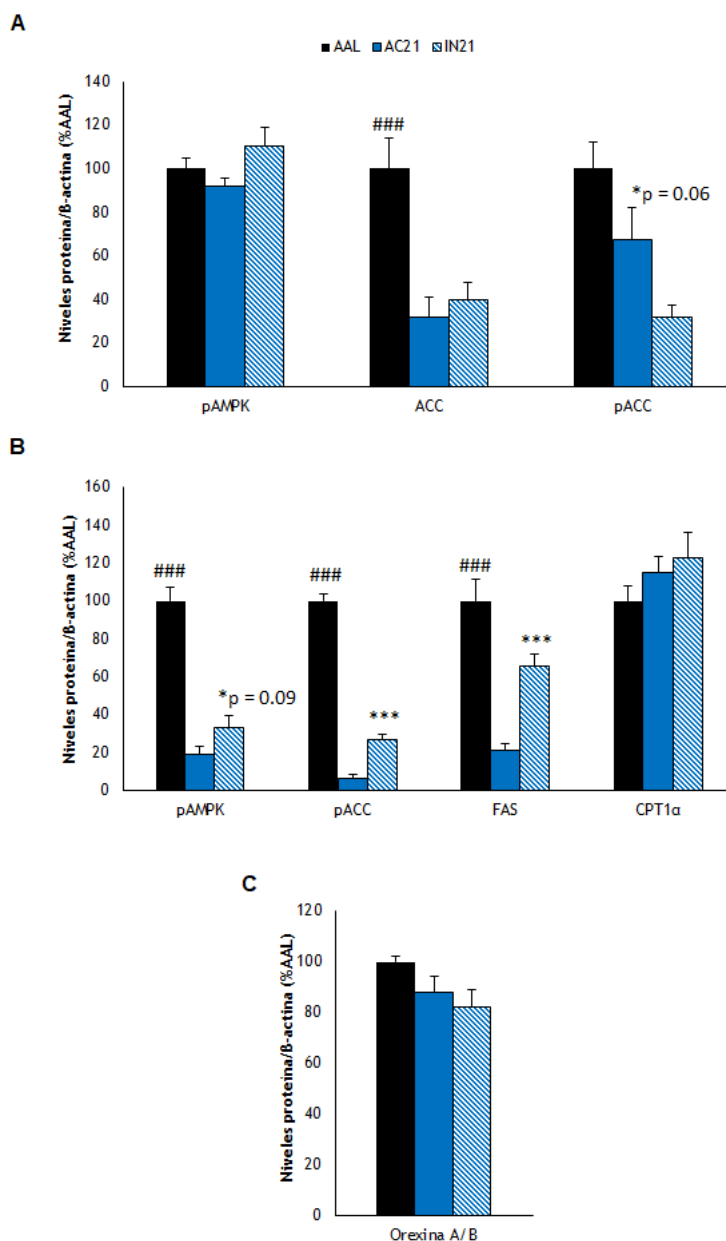


Figura 58. Niveles de proteína de la ruta de AMPK en el núcleo ventromedial (A), niveles de proteína de la ruta de AMPK en el hígado (B) y niveles de orexinas en el área lateral hipotalámica (C). Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-8$ animales por grupo experimental. *AC21 vs IN21: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. AC21 vs AAL: # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ y ### $p < 0.001$.

Nuevamente volvemos a encontrarnos una disminución de los niveles de FAS, $p < 0.0001$, cuando estos deberían estar elevados a causa de la activación de la lipogénesis *de novo* desencadenada por pACC. Por otro lado, no se detectaron diferencias significativas en los niveles de CPT1 α , $p = 0.634$. Por último, tampoco se detectaron diferencias en los niveles de orexinas en área lateral del hipotálamo, $p = 0.543$ (Figura 58C).

En segundo lugar, la comparación del grupo expuesto a ABA con un grupo que tiene acceso a rueda de actividad, pero con comida ad libitum, nos permite estudiar los efectos de la restricción de comida. Las diferencias en el peso corporal, la ingesta y la temperatura corporal fueron las mismas que con respecto al grupo IN21. Como se puede observar en la Figura 57, si bien no se detectaron diferencias significativas en los niveles de los $\beta 3$ -AR, $p = 0.308$, la menor temperatura corporal de las ratas a restricción de alimento se correlaciona con menores niveles de UCP1 y una menor temperatura en la piel del área del BAT (ambas $p < 0.01$). En el ventromedial (Figura 58A), los enzimas de la vía de señalización de AMPK no sufrieron variaciones, aunque ACC y pACC tendió a disminuir, siendo estadísticamente significativo únicamente para ACC, $p < 0.0001$. A nivel periférico, en el hígado (Figura 58B), sí se activó la síntesis de ácidos grasos a través de la reducción de pAMPK y pACC (ambas $p < 0.0001$). Como ha ocurrido hasta el momento, los niveles de FAS en lugar de estar elevados se presentaron extremadamente disminuidos, $p < 0.0001$, pero no se detectaron diferencias significativas en CPT1 α , $p = 0.224$. De nuevo, no se detectaron diferencias significativas en los niveles de orexinas, $p = 0.107$ (Figura 58C).

3.2.5. Comparación metabólica de animales expuestos al procedimiento ABA a temperatura estándar con animales expuestos a ABA que se recuperan al incrementar la temperatura ambiental.

Por último, se comparó dos grupos que han sido expuestos al procedimiento ABA pero que mientras en un caso la temperatura estándar se había mantenido constante (AC21) y todos los animales alcanzaron el criterio de retirada (pérdida de peso del 25%), en el segundo grupo la temperatura ambiental se había incrementado hasta los 32°C una vez que los animales habían perdido un 20% de peso y todos los animales habían alcanzado el criterio de recuperación ($n < n-4$) (AC32). Estas ratas expuestas a calor presentaron al final del experimento un mayor peso corporal, una mayor temperatura corporal y una mayor ingesta.

Como se puede observar en la Figura 59, el grupo AC32, aunque no presentó diferencias en los niveles proteicos de los receptores beta3-adrenérgicos ($p = 0.569$), sí se observó una disminución significativa en los niveles de UCP1 ($p = 0.002$), que no se correlacionan con la elevada temperatura del cuerpo y de la piel del área del BAT ($p < 0.0001$).

Con respecto al núcleo ventromedial, representado en la Figura 60A, se produjo una reducción de las formas fosforiladas, pAMPK y pACC (ambas $p < 0.05$), sin diferencias en ACC, $p = 0.826$. Por lo tanto, la exposición al calor activa la lipogénesis *de novo* en este núcleo hipotalámico.

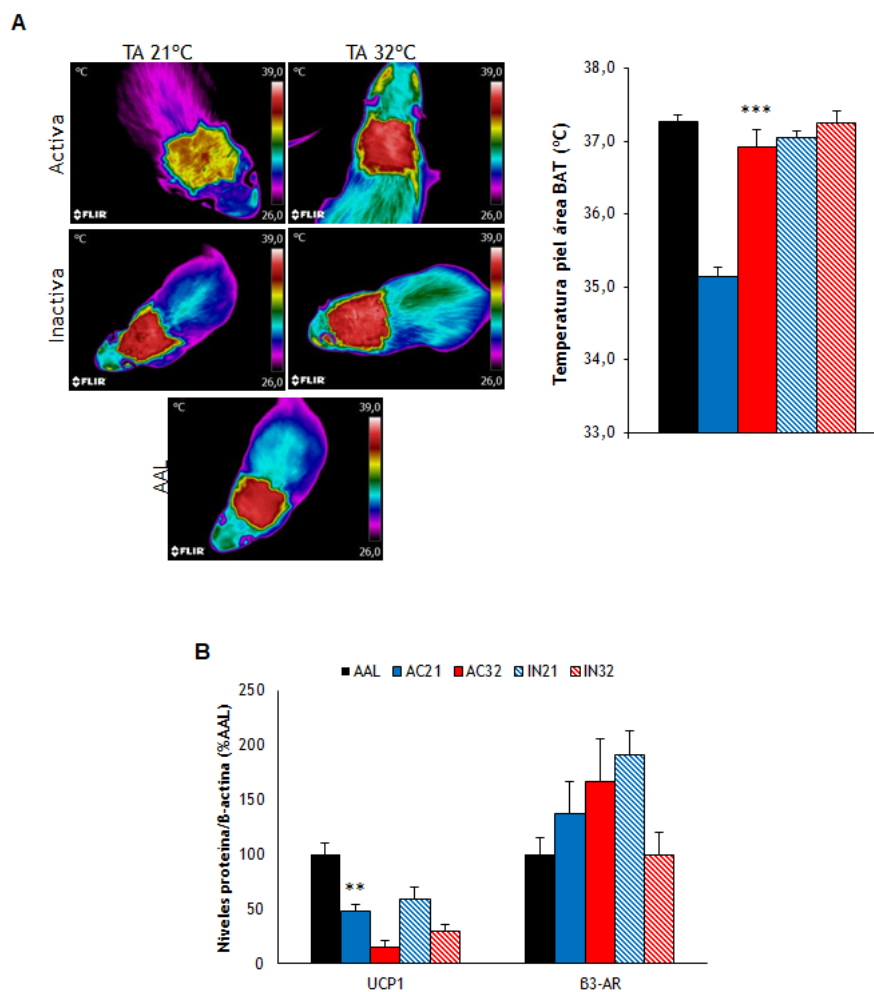


Figura 59. Imágenes térmicas representativas (panel izquierdo) y temperatura de la piel del área del BAT (A), niveles de UCP1 y receptor B3-adrenérgico (B). Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-11$ animales por grupo experimental. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

En el hígado (Figura 60B), la exposición al calor produjo una reducción en la vía de síntesis de lípidos ya que pAMPK y pACC estaban aumentados, aunque solo llegó a alcanzar la significación pACC ($p = 0.001$). De nuevo, FAS en lugar de estar regulado a la baja, se presentó extremadamente elevado, $p < 0.0001$. Además, los bajos niveles de CPT1 α , $p = 0.010$, sugieren la inhibición de la β -oxidación en este tejido.

Para finalizar, los niveles de orexinas, presentados en la Figura 60C, no se vieron alterados con la aplicación de calor, $p = 0.807$.

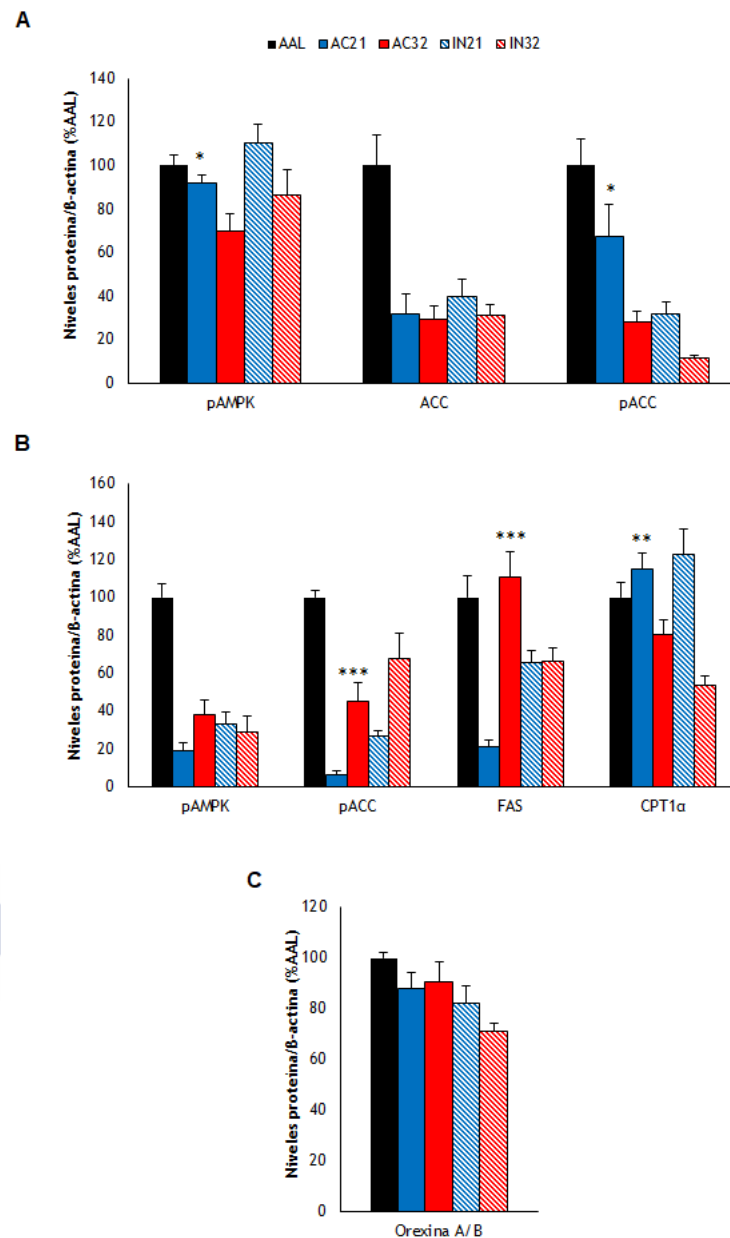


Figura 60. Niveles de proteína de la ruta de AMPK en el núcleo ventromedial (A), niveles de proteína de la ruta de AMPK en el hígado (B) y niveles de orexinas en el área lateral hipotalámica (C). Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-8$ animales por grupo experimental. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

4. DISCUSIÓN

Los resultados presentados en este capítulo suponen una replicación del estudio publicado por Gutiérrez et al. (2008), en el que ratas macho son recuperadas de las consecuencias del modelo ABA, incluso después de haber perdido un 20% de su peso inicial, a través del aumento de la temperatura ambiente a 32°C. Este estudio junto con otro realizado en hembras (Cerrato et al., 2012) supuso la demostración experimental del efecto de la temperatura ambiental sobre

la reversión del modelo ABA. La hipótesis que precede a estos estudios, como ya hemos comentado, hace referencia a que la hiperactividad en un contexto de restricción de la alimentación es una respuesta adaptativa para compensar la hipotermia derivada de la pérdida de peso (Gutiérrez, 2002). Por lo tanto, en este estudio hemos logrado los mismos resultados con la elevación de la temperatura ambiente: una reducción de la hiperactividad y de la pérdida de peso, logrando que el 100% de los animales alcanzaran el criterio de recuperación (un peso corporal en el día n superior al del día $n-4$). Los estudios realizados en este capítulo, en comparación con los anteriormente citados, presenta una ventaja: la utilización de un mecanismo de telemetría que nos permite monitorizar la temperatura corporal de los animales a lo largo de todo el experimento. Así, los resultados obtenidos con respecto a la temperatura corporal mostraron que los animales expuestos a un contexto de rueda de actividad y restricción de alimento sufren de hipotermia, ya que la temperatura corporal desciende con el paso de los días y es especialmente pronunciada una vez que se ha perdido el 20% del peso inicial. En el caso de los animales expuestos únicamente a restricción de alimento (Inactivos), la temperatura corporal también desciende, aunque de manera menos pronunciada. Por el contrario, los animales expuestos a un ambiente cálido de 32°C, tanto Activos como Inactivos, evitan la hipotermia y alcanzan valores superiores al de tres días atrás, antes de cumplir el criterio de pérdida de peso (CPP20%). Además, no se produce hipertermia, sino que se reestablece la temperatura corporal a niveles fisiológicos, ya que no superan la temperatura corporal de las ratas Activas con alimentación ad libitum.

Conocido el efecto de la temperatura ambiente elevada sobre las consecuencias del modelo ABA, y especialmente, sobre la temperatura corporal de estos animales se decidió estudiar el mecanismo por el cual el calor estaba actuando. El BAT es el tejido encargado de regular la temperatura corporal cuando los mecanismos, o bien de disipación de calor, o bien generadores de calor, no son suficientes (Cannon & Nedergaard, 2004; Morrison et al., 2014), por lo que resulta intuitivo estudiarlo en primer lugar. Así, los animales sometidos a restricción de alimento redujeron el gasto energético a través de la disminución de la termogénesis en el BAT, lo que supone una estrategia para ahorrar energía, aunque conllevó a un estado de hipotermia (Sakurada et al., 2000; Young, Saville, Rothwell, Stock, & Landsberg, 1982; Zhang et al., 2012). Por otro lado, el calor también redujo los principales marcadores termogénicos del BAT, incluida la expresión proteica de UCP1, lo que supone un ahorro energético en el mantenimiento de la temperatura corporal que, unida al descenso de la actividad y el aumento de la ingesta, permitió el incremento del peso corporal y la recuperación de las ratas expuestas al modelo ABA.

Actualmente existe una gran evidencia que relaciona la vía de señalización de AMPK en el hipotálamo, y más concretamente en el núcleo ventromedial, con la regulación de la termogénesis en el BAT (López et al., 2018). Al analizar la ruta de AMPK hipotalámica no se detectaron diferencias en ninguno de los diferentes enzimas en hipotálamo entero de rata, ni tampoco en el núcleo arcuato. Con respecto al núcleo ventromedial, las ratas activas mantenidas a 21°C presentan una reducción de FAS en comparación con las Inactivas también a 21°C, mientras que no se detectaron diferencias en pACC ni pAMPK. Además, la aplicación de calor en las ratas Inactivas únicamente produce una reducción de los niveles proteicos de FAS, mientras que en las ratas Activas se produjo tanto una disminución de pACC como de FAS, pero en ningún caso se producen cambios en pAMPK. Si bien la vía de AMPK se activa tras la privación de alimento (Hardie, Ross, & Hawley, 2012; Iio et al., 2015), algún estudio detectó lo contrario, una reducción de los niveles de AMPK en ratones sometidos al modelo ABA (Nobis et al., 2018). Estas discrepancias pueden ser debidas a que AMPK también se ve

afectado por el estrés regulándose a la baja (Iio et al., 2012) y por los ritmos circadianos, activándose (Bailey, Udoh, & Young, 2014). Ambos aspectos están presentes en el modelo ABA, ya que en sí mismo el procedimiento es estresante y la exposición a una temperatura ambiente de 21°C también supone un leve estrés para los animales (Gordon et al., 1991). Además, el modelo ABA produce un desajuste de los ritmos circadianos (Watanabe et al., 1992). Por lo tanto, aunque el modelo ABA produce una reducción en el enzima encargado de la síntesis de ácidos grasos, que es todavía más pronunciado cuando son sometidos a calor, esta no parece estar mediada por las acciones de AMPK.

Con respecto al control del balance energético a nivel periférico se estudió la vía de señalización de AMPK en el hígado. Si bien las pacientes con anorexia nerviosa presentan una moderada esteatosis hepática y un metabolismo lipídico anormal (De Caprio et al., 2006; Meczekalski, Podfigurna-Stopa, & Katulski, 2013; Rautou et al., 2008) los animales Activos a 21°C mostraron los niveles más bajos de triglicéridos hepáticos, asociados a unos bajos niveles de FAS. Por otro lado, también mostraron los niveles más altos de colesterol, lo que correlaciona con la hipercolestoremia en pacientes (Halmi & Fry, 1974; Klinefelter, 1965; Matzkin, Geissler, Coniglio, Selles, & Bello, 2006; Nestel, 1974; Ohwada, Hotta, Oikawa, & Takano, 2006). El calor, por su parte, produjo la regulación al alza de la enzima FAS en ratas Activas, lo que se asoció con una mayor cantidad de triglicéridos hepáticos y circulantes, y más cantidad de colesterol en sangre, similar a algunos casos ocurridos tras la renutrición de pacientes (Feillet et al., 2000). Como ya hemos dicho, la acumulación de triglicéridos en el hígado se asocia con la esteatosis hepática pero la tinción con Oil-Red no detectó grasa en el hígado de ninguno de los grupos experimentales. Además, el calor también permitió en las ratas Activas una mayor reserva energética en el hígado en forma de glucógeno.

Los niveles de leptina circulante varían en función de la adiposidad (Considine et al., 1996; Schwartz, Peskind, Raskind, Boyko, & Porte, 1996; Schwartz et al., 1997) y la anorexia nerviosa se caracteriza por el desarrollo de hipoleptinemia (Föcker et al., 2011; Korek et al., 2013; Misra et al., 2005). Estos hechos se correlacionan con la reducción detectada en los niveles plasmáticos de las ratas ABA y con el agotamiento de las reservas de tejido adiposo blanco gonadal, los cuales son reestablecidos con la aplicación de calor. Además, estas ratas ABA, presentaron bajos niveles de expresión tanto en los marcadores de lipogénesis como de lipólisis, mientras que el calor restableció estos valores. En las ratas Inactivas, a simple vista no fue posible detectar diferencias en las reservas de grasa, y de hecho no se detectaron grandes diferencias en estos marcadores, incluso cuando fueron expuestas a calor. Por otro lado, se conoce que el ejercicio prolongado produce *browning* en el tejido adiposo subcutáneo (Wu, Bikopoulos, Hung & Ceddia, 2014), lo cual es coherente con nuestros resultados en el que el tejido adiposo gonadal de las ratas ABA, independientemente de la temperatura ambiente a la que fueron expuestas, muestran un menor tamaño de los adipocitos y una mayor tinción de UCP1, aunque no se tradujo en una mayor expresión de marcadores termogénicos (Fuller-Jackson, Clarke, Rao & Henry, 2018). Esto puede ser debido a que la capacidad de producir *browning* por parte del tejido adiposo blanco depende del depósito de grasa en concreto, siendo mayor en el caso del tejido adiposo subcutáneo (Wu et al., 2014).

En cuanto al músculo esquelético, los niveles de los marcadores de caquexia Atrogina-1 y Murf-1, fueron los más elevados en las ratas Activas a 21°C, lo que se correlaciona con la hiperactividad desarrollada por estas ratas y con la pérdida de masa magra (Yuan et al., 2015). Cuando estos animales Activos son calentados a 32°C, su actividad se reduce a niveles similares a los de una rata Activa con alimentación ad libitum, y, en consecuencia, la expresión de los

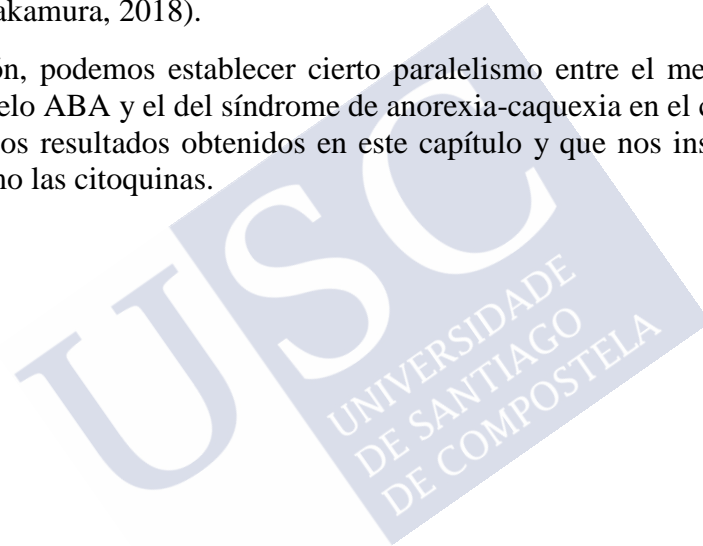
marcadores de caquexia se reduce al mismo nivel que el de los animales Inactivos. Incluso en estos animales Inactivos, estos marcadores se mostraron más reducidos cuando fueron expuestos a calor. Desde una perspectiva traslacional, el calor también podría ser una buena estrategia para recuperar la masa magra y la densidad mineral ósea, aspectos interrelacionados (Coëffier et al., 2016), en contraposición a la clásica imposición de reposo en cama. La estrategia de obligar a las pacientes con anorexia nerviosa a guardar reposo en cama durante cierto tiempo es comúnmente aplicada en la mayoría de los internamientos hospitalarios (APA, 2006), a pesar de que puede producir un aumento de la grasa visceral (Milanese et al., 2014) que podría conllevar mayores molestias estomacales (Coëffier et al., 2016) y que la inmovilización supone un factor de riesgo para la pérdida ósea (Ivuskans et al., 2015).

También es importante resaltar que las pacientes con anorexia nerviosa suelen presentar hipercortisolemia, es decir, altos niveles de cortisol en sangre (Hotta et al., 1986; Kaye et al., 1987; Mehler & Brown, 2015; Sauro, Ravaldi, Cabras, Faravelli & Ricca, 2008). El modelo ABA es catalogado como un modelo de estrés e igualmente que ocurre en humanos, las ratas expuestas al modelo ABA presentan altos niveles de corticosterona (de Rijke et al., 2005; White et al., 1993). Así, las ratas Activas a 21°C de este estudio muestran los mayores niveles de corticosterona de todos los grupos experimentales que son reducidos con la exposición al calor, lo que es coherente con los resultados obtenidos con pacientes recuperadas en las cuales se normaliza la actividad del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (Monteleone, Serino, Amodio, Monaco & Maj, 2016; Sauro et al., 2008).

Por lo tanto, podemos concluir que en el modelo ABA se produce una reducción del tejido adiposo blanco y del músculo esquelético similar a la que se produce en el cáncer. La anorexia-caquexia es un síndrome metabólico que ocurre en diversas patologías crónicas, entre ellas el cáncer, caracterizado por la disminución del apetito y pérdida de peso acompañada de una pérdida continua de masa muscular esquelética y atrofia del tejido adiposo, que no puede ser revertida completamente con soporte nutricional (Argilés, Moore-Carrasco, Fuster, Busquets, & López-Soriano, 2003; Fearon, Glass, & Guttridge, 2012; Fearon et al., 2011). A nivel hipotalámico, este proceso parece estar relacionado con diferentes alteraciones desencadenadas por el aumento de factores proinflamatorios, especialmente de IL-1 y TNF α , en el que se ve implicado una activación del sistema de melanocortinas (Laviano et al., 2008), lo que se correlaciona con la elevada expresión proteica de IL-6 hipotalámico de este estudio y la sobre activación de los receptores MC4R (y que fue revertida por el calor) detectada por nuestro grupo (Gutiérrez et al., 2009). El aumento de la expresión de citoquinas en el hipotálamo también se ha relacionado con un cambio inapropiado de la oxidación de ácidos grasos a la síntesis de ácidos grasos, en el que una disminución de FAS hace aumentar las concentraciones de malonil-CoA, suprimiendo la ingesta de alimentos (Laviano et al., 2008). Además, el aumento de malonil-Coa inhibe la actividad de CPT1 que es la principal enzima reguladora de la oxidación de ácidos grasos. En este estudio detectamos también una disminución de FAS hipotalámico que no se relacionaba con los valores de pACC y en el que no está implicado la vía de señalización de AMPK. Estos datos correlación con lo detectado por Lopez et al. (2006), en el que los efectos anoréxicos producidos por la administración de tamoxifeno se asocian a un aumento en las concentraciones de malonil-CoA y la inhibición de la expresión de FAS en el núcleo ventromedial, sin detectar cambios en los niveles proteicos de AMPK. En relación con el tejido adiposo, se ha demostrado la regulación a la baja de factores adipogénicos que sugiere un deterioro en la formación y la capacidad de almacenamiento de lípidos en la caquexia derivada del cáncer (Chen Bing & Trayhurn, 2009). Por otro lado, la lipólisis está incrementada debido a la reducción de LPL (Thompson, Koons, Tan, & Grigor, 1981) y al incremento de

HSL (Thompson, Cooper, Parry, & Tuckey, 1993). Así, en la anorexia nerviosa ocurre el mismo proceso de inhibición de los factores lipogénicos, pero también se redujo la lipólisis, ya que se presentaron niveles reducidos de HSL y CPT1 β , los cuales fueron revertidos con la aplicación de calor. Por otro lado, las ratas sometidas al modelo ABA también mostraron una reducción en el tamaño de los adipocitos y un espacio intersticial dilatado, al igual que ocurre en la caquexia por cáncer (Bing et al., 2006). Por el contrario, las ratas Activas a las que se le aumentó la temperatura ambiente no mostraron un mayor tamaño de las células adiposas en comparación a las mantenidas a 21°C. Con respecto al músculo esquelético, en la caquexia del cáncer también se observa un aumento de los marcadores Murf-1 y Atrogina-1 (Johns, Stephens, & Fearon, 2013; Yuan et al., 2015) al igual que en las ratas sometidas al modelo ABA. Otro factor diferenciador de la anorexia nerviosa y la caquexia por cáncer reside en el aumento de la termogénesis adaptativa que se sufre en este último (Beijer et al., 2012), incluso cuando los animales son aclimatados a una temperatura ambiente de 28°C (Tsoli et al., 2012). En el caso de las ratas sometidas al modelo ABA, como era de esperar, presentaron una UCP1 reducida, tanto a 21°C como a 32°C, por lo que parece indicar un correcto funcionamiento del BAT (Nakamura & Nakamura, 2018).

En conclusión, podemos establecer cierto paralelismo entre el metabolismo de una rata sometida al modelo ABA y el del síndrome de anorexia-caquexia en el cáncer que nos permite entender mejor los resultados obtenidos en este capítulo y que nos inspira nuevas dianas de estudio tales como las citoquinas.





CAPÍTULO SEXTO

Resumen, conclusiones y líneas futuras de investigación





1. IMPLICACIONES EN EL ÁMBITO CLÍNICO

En la introducción teórica poníamos de relieve que, si bien la producción y calidad de la evidencia para los tratamientos de la anorexia nerviosa había aumentado en los últimos años, lamentablemente ninguno de ellos, ya sea psicológico o farmacológico, había demostrado ser eficaz. También adelantábamos y poníamos en duda la relevancia de la preocupación por la figura y el peso, así como las alteraciones de la imagen corporal, como elementos esenciales para el diagnóstico de la anorexia nerviosa y destacábamos el papel de los modelos animales para la exploración y desarrollo de nuevos tratamientos (Casper et al., 2008).

Obviamente, un modelo animal no puede reproducir las capacidades cognitivas y de simbolización propias de los seres humanos, ni tampoco el entorno familiar o el trasfondo sociocultural donde se desarrolla el trastorno (Gutiérrez, 2013), por lo que son comunes las reticencias por parte de la comunidad científica a la hora de aceptar planteamientos que provienen de la investigación con estos modelos animales. Así, la incapacidad de los modelos animales análogos de la anorexia nerviosa para reproducir síntomas como la “fobia al peso” o “las preocupaciones por el peso” suele ser una de sus principales críticas. Si bien esto es cierto, también existen evidencias que ponen en duda la relevancia de estas características. Por un lado, las preocupaciones por el peso y la fobia a la grasa no son muy frecuentes en las descripciones de los casos anteriores a la conceptualización de Hilde Bruch, y más importante, se ha documentado la ausencia de estas preocupaciones en un porcentaje importante de pacientes tanto de países occidentales como en muestras asiáticas (Lee et al., 2012). De hecho, más del 20% de las pacientes diagnosticadas con anorexia nerviosa en el entorno occidental, y del 59% en los países asiáticos atribuyen razones no psicológicas para el rechazo de los alimentos, tales como malestar abdominal, hinchazón de estómago, falta de apetito o de hambre, náuseas, etc., dando lugar a lo que denominan “anorexia nerviosa sin fobia a la grasa” (Becker, Thomas, et al., 2009). En segundo lugar, algunos síntomas de la anorexia nerviosa como el pensamiento obsesivo, la depresión, la ansiedad, la disminución de la lívido, la irritabilidad o la sensación de ineficacia personal, pueden ser considerados una consecuencia del estado de inanición que desaparecen con el restablecimiento nutricional, tal y como demostró el estudio realizado por Keys et al. (1950) y que hemos descrito en la introducción teórica.

En consecuencia, reiteramos la importancia y la idoneidad del empleo de los modelos animales análogos de la anorexia nerviosa para la mejora del tratamiento de este trastorno, que ofrece una nueva perspectiva de los signos, no de los síntomas, más objetivos de la anorexia nerviosa (Cerrato, 2010). Una de las principales contribuciones de la investigación con modelos animales análogos de la anorexia nerviosa, concretamente del modelo ABA, es que la hiperactividad ya no es considerada una mera estrategia voluntaria para quemar calorías, sino que se considera un comportamiento impulsado biológicamente que además posee entidad clínica propia (Gutiérrez, 2013). La importancia de encontrar una estrategia eficaz para controlar la hiperactividad radica en el hecho de que supone una amenaza directa para la ganancia y el mantenimiento del peso corporal ya que aumenta el gasto energético y además tiene un efecto inhibitor sobre el apetito. También está asociada con la ansiedad en los pacientes hospitalizados y es un comportamiento particularmente difícil de manejar para el personal sanitario.

Con respecto a las dos estrategias empleadas en la presente Tesis Doctoral para combatir la hiperactividad, leptina y aumento de la temperatura ambiente, en ambos casos se insta con urgencia a ser empleados con pacientes hospitalizadas (Hebebrand & Albayrak, 2012; Zandian et al., 2017). Debido a la propia naturaleza de la leptina como inhibidora de la ingesta y del peso corporal, la comunidad médica no ha permitido el empleo de esta hormona como tratamiento para la anorexia nerviosa. Por otro lado, algunos estudios han indicado efectos beneficios en otras enfermedades como la lipodistrofia, caracterizada por una total o parcial reducción del tejido adiposo, bajos niveles de leptina en sangre y graves alteraciones metabólicas, siendo las náuseas el único efecto secundario (Chan et al., 2011). Ante estos estudios, Hebebrand & Albayrak (2012) presionan para que se comiencen a realizar ensayos clínicos en los que se administre leptina a las pacientes con anorexia nerviosa, ya que consideran que sus efectos sobre el peso corporal y la ingesta serían fácilmente manejables en un ámbito hospitalario muy controlado y empleando bajas dosis de la hormona.

Con respecto a la relación de una elevada temperatura ambiental y sus beneficios en pacientes con anorexia nerviosa, encontramos mayor y más diversa evidencia. En primer lugar, la demostración de que las pacientes con anorexia nerviosa son significativamente más activas durante los meses más fríos del año, descartando su relación con otras características psicopatológicas (insatisfacción corporal o ansia por la delgadez), la depresión, la ansiedad o incluso la hipoleptinemia (Carrera et al., 2012). En segundo lugar, la influencia del calor sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, en el que las pacientes logran recuperar la menstruación durante los meses más cálidos del año y además necesitan un promedio de 2 kilos menos para lograrlo (Favaro & Santonastaso, 2009). En tercer lugar, un estudio retrospectivo demostró que, dependiendo del subtipo diagnóstico, la temperatura ambiental es un factor determinante en las diferencias de peso en el momento del ingreso, mostrando un mayor IMC por parte de las pacientes con anorexia nerviosa restrictiva en los meses cálidos del año (Fraga et al., 2015). En cuarto lugar, Zandian et al. (2017) redujeron la ansiedad postprandial de las pacientes aumentando la temperatura ambiente hasta 32°C, la misma que empleamos en nuestros estudios con los modelos animales. Por último, una medida más indirecta de la relación entre la temperatura ambiente y la incidencia del trastorno se desprende de un estudio bibliométrico que reveló que la mayoría de las publicaciones sobre anorexia nerviosa se encontraron en el hemisferio norte, en el rango 40°-55° (Vázquez et al., 2006; Gutiérrez et al., 2017).

En relación con los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, parece más aconsejable el empleo del calor como tratamiento para la anorexia nerviosa, gracias a su robusto apoyo experimental tanto en modelos animales como en estudios con pacientes hospitalizadas. Respecto a la leptina, a parte de la ausencia de una asociación simple y lineal entre la leptina y la actividad física en pacientes (Stengel et al., 2017), unido a la escasa evidencia en modelos animales y los resultados aquí obtenidos, generan más duda sobre su idoneidad como tratamiento. Por otro lado, la leptina solo podría aplicarse en el caso de pacientes hiperactivas, mientras que el calor ha demostrado ser beneficioso también en animales a restricción de alimento sin acceso a rueda de actividad, permitiendo una mayor ganancia de peso a pesar de una menor ingesta (Cerrato et al., 2012). Finalmente, los indicios experimentales obtenidos con el calor pueden llegar a invalidar la relación observada entre hipoleptinemia e hiperactividad. Esto se basa en la idea de que un mecanismo potencial que explicaría la acción de la leptina sobre la actividad sería por medio de la elevación de la temperatura corporal que frenaría el recurso de los animales a la actividad física como mecanismo termorregulatorio de sostén.

2. LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN

Tras el desarrollo experimental de esta tesis, se plantean nuevas preguntas relacionadas tanto con la investigación con los modelos animales análogos de la anorexia nerviosa como desde una perspectiva traslacional.

Hemos demostrado que el aumento de la temperatura ambiente ejerce efecto sobre el programa termogénico del tejido adiposo pardo y que en la homeostasis energética de estos animales el sensor AMPK no tiene un papel relevante. Debido a la naturaleza integrada y no lineal de los neurocircuitos que regulan el balance energético, podrían existir otras vías y otras áreas hipotalámicas sobre las que el aumento de la temperatura ambiente suponga una implicación más trascendental. Generalmente, la estrategia convencional empleada para estudiar estos neurocircuitos suele ser de “dentro hacia fuera”, es decir, se produce una modificación en el medio interno del animal con el objetivo de alterar su comportamiento, pero en el que entorno permanece inalterable. Con la aplicación de calor ocurre lo contrario, por lo que quizás sería más interesante centrarse en primer lugar en el área preóptica del hipotálamo, principal núcleo encargado de regular la temperatura corporal. También, siguiendo la estrategia típica de “dentro hacia fuera”, sería interesante la manipulación de los receptores de potencial transitorio (TRP), encargados de detectar el frío (TRPA1 y TRPM8) y el calor (TRPV3 y TRPV4), presentes en esta área (Nilius & Flockerzi, 2014) con antagonistas y agonistas junto con la aplicación de calor, para así ayudar a revelar la jerarquía de los cambios necesarios que permiten al calor recuperar a los animales sometido al procedimiento ABA. Otra opción también sería estudiar el sistema cannabinoide y comparar los efectos beneficios de la administración de agonistas con la administración del calor sobre la hiperactividad y el peso corporal.

A nivel molecular también sería interesante evaluar las repercusiones de la elevación de la temperatura ambiental sobre el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA) que se presenta elevado en animales expuestos al modelo ABA y en pacientes con anorexia nerviosa (Ross, Mandelblat-Cerf, & Verstegen, 2016). En esta línea, también sobre el eje hipotalámico-pituitario-gonadal (HPG), ya que cuando las hembras son sometidas al procedimiento ABA sufren alteraciones en el ciclo estral que podrían recuperar con la aplicación de calor, dada la asociación encontrada entre temperatura ambiente y ciclo menstrual en pacientes con anorexia nerviosa (Favaro & Santonastaso, 2008).

Al igual que los diferentes tiempos de administración de la comida dan lugar a un mejor o peor desempeño en el procedimiento ABA, los efectos de la aplicación de calor también pueden ser susceptibles a estos cambios. Por lo tanto, sería interesante manipular la aplicación del calor en función de los ciclos circadianos de luz y oscuridad, antes o después de recibir la ración de comida, etc.

Por último, en relación con futuras investigaciones con los modelos animales, los estudios desarrollados en esta tesis fueron realizados con ratas macho por lo que sería interesante replicar estos y otros futuros estudios en hembras, lo que proporcionaría más robustez.

Centrándonos ahora en el ámbito clínico, algunas líneas de investigación posibles sería determinar los efectos terapéuticos de la aplicación de calor sobre la hiperactividad, la ingesta, la recuperación del peso y la psicopatología en pacientes con anorexia nerviosa, lo que mejoraría el tratamiento que se realiza en las unidades hospitalarias y ambulatorias y quizás

también ejerciese un efecto beneficioso sobre la satisfacción de las pacientes con el tratamiento y sobre la tasa de recaídas.

3. RESUMEN Y CONCLUSIONES

En la presente Tesis Doctoral hemos empleado dos modelos animales análogos de la anorexia nerviosa, ABA y SIH, para poner a prueba las distintas hipótesis asociadas a los correspondientes objetivos. Ambos modelos se reconocen como análogos de la anorexia nerviosa en cuanto al paralelismo que presentan por las elevadas tasas de actividad en los animales sujetos a una alimentación restringida. Ambos modelos, aunque similares en la manifestación de una actividad excesiva, presentan diferencias principalmente en cuanto a las exigencias de adaptación que deben de soportar los animales.

Como se mostró en la revisión de la literatura en los capítulos precedentes, el uso de leptina exógena y la aplicación de calor han mostrado ser dos estrategias eficaces para la reducción de la hiperactividad en el modelo ABA, aunque únicamente el calor logró una mejora sustancial en la ingesta y el peso corporal de los animales permitiendo su recuperación en el 100% de los casos, mientras que la leptina tuvo consecuencias desfavorables sobre la ingesta y el peso corporal, aspectos cruciales en la recuperación de los animales. Por otro lado, en el modelo SIH, que supone una menor exigencia de adaptación de los animales al programa de alimentación restringida, la literatura recoge un único estudio en el que la leptina también logró reducir la hiperactividad, pero sin producir cambios en el peso corporal, por lo que los animales continuaron perdiendo peso igual que los animales tratados con vehículo.

Por ello, en primer lugar, intentamos comprobar la eficacia comparativa del calor y la leptina en la prevención de la hiperactividad en el modelo SIH a través de la replicación del estudio original de Exner et al. (2000). Partiendo de la evidencia existente previa a la realización de la presente Tesis Doctoral, predecíamos una eficacia comparable de ambas estrategias en la reducción de la actividad, pero un efecto más beneficioso del calor, ya que no sólo reduciría la actividad, sino que también reduciría la pérdida de peso. En contra de la primera predicción, la leptina no produjo ningún efecto inhibitorio de la actividad media diaria, pero sí produjo una reducción transitoria en la proporción de actividad diurna respecto a la actividad diaria total. Por otro lado, la aplicación de calor a través de la elevación de la temperatura ambiente a 32°C, se mostró eficaz en la reducción de la actividad y el peso corporal, confirmando las predicciones realizadas. Como consecuencia a la ausencia de efecto de la leptina en la reducción de la hiperactividad en el modelo SIH, se realizaron una serie de estudios con el objetivo de dilucidar las posibles razones subyacentes a la ausencia de efecto de la leptina; a saber, la actividad basal excesiva, la influencia de la temperatura ambiente, la dosis de leptina y el origen de la leptina recombinante empleada. Sin embargo, a pesar de reducir la actividad basal con el acortamiento de la línea de base o del aumento de la temperatura ambiente hasta 25°C los resultados obtenidos se mantuvieron en la misma línea mostrando la ausencia de un efecto inhibitorio de la leptina sobre la actividad en animales sometidos al procedimiento SIH. Tampoco el aumento de la dosis de leptina hasta casi el doble o el uso de leptina de ratón produjo efectos netos sobre la actividad. Pero reiteradamente observamos el efecto de la leptina en la disminución de la proporción de actividad diurna, independientemente de la dosis empleada o del tipo de leptina.

Conocido el efecto del calor en la prevención y reversión de la hiperactividad y del peso corporal en el modelo ABA (Cerrato et al., 2012; Gutiérrez et al., 2006, 2008; Hillebrand et al., 2005b), además de su capacidad para producir cambios bioquímicos en el sistema de melanocortinas (Gutiérrez et al., 2009), y ahora también en la prevención del modelo SIH, se realizaron dos estudios para tratar de encontrar los mecanismos de acción por el que la manipulación de la temperatura ambiente produce todos los cambios comportamentales, modulando el proceso de deterioro y de recuperación. Así, nos centramos en el estudio del programa termogénico del tejido adiposo pardo, principal órgano encargado de la termogénesis adaptativa, y la posible implicación de AMPK, principal sensor energético celular, que participa en la regulación de la ingesta, el peso corporal y la termogénesis adaptativa en el BAT (Contreras et al., 2016; Gonzalez-Garcia et al., 2018; Lopez et al., 2010; Martinez-Sanchez et al., 2017; Martinez de Morentin et al., 2012), a nivel hipotalámico y también en tejidos periféricos como el hígado. Con el objeto de obtener una visión más global del estado metabólico de estos animales también se analizaron otros tejidos periféricos como el tejido adiposo blanco y el músculo.

A continuación, se mostrarán las conclusiones realizadas con respecto a los resultados extraídos de la utilización del modelo SIH y seguidamente las conclusiones referidas al modelo ABA. Así, en primer lugar y de forma más detallada, enumeramos las siguientes conclusiones con respecto al modelo SIH:

1. La elevación de la temperatura ambiente reduce significativamente la actividad en ratas expuestas al procedimiento SIH.
2. El uso de leptina exógena no redujo el incremento de la actividad en la rueda de ratas expuestas al procedimiento SIH, pero sí produjo una reducción en la proporción de la actividad diurna con respecto a la actividad media total. Este efecto de la leptina se manifestó tanto si los animales habían alcanzado una tasa estable de actividad durante la línea de base de cuatro semanas de duración, como si los animales afrontaban la restricción de alimento mientras su actividad mostraba un ritmo creciente durante la línea de base más corta, de dos semanas de duración. Esta reducción de la proporción de la actividad diurna con respecto a la actividad media total fue más duradera con la dosis más alta de leptina y más breve cuando la temperatura ambiente se estableció desde el principio del procedimiento en 25°C.
3. La elevación de la temperatura ambiente previene de forma radical la tendencia a perder peso de los animales expuestos al procedimiento SIH, e incluso permite la ganancia de peso corporal cuando la actividad durante la línea de base fue estable.
4. La pérdida de peso que muestran los animales expuestos al procedimiento SIH fue similar independientemente del tratamiento con vehículo o leptina.
5. La leptina exógena redujo la ingesta durante los primeros 90 minutos después de recibir la ración de comida en menor medida que la reducción mostrada por los animales expuestos a una TA elevada. Este dato vuelve a reforzar, como ya había sido descrito por Cerrato et al (2012) que, en condiciones de alimentación restringida, un ambiente más cálido es más determinante que la disponibilidad de alimentos para el aumento de peso corporal. En nuestro caso podemos matizar que, en condiciones de igualdad de acceso al alimento, el incremento térmico ambiental se traduce en una mayor ganancia de peso corporal.

6. La elevación de la temperatura ambiente previno la hipotermia en ratas expuestas al procedimiento SIH.
7. La elevación de la temperatura ambiente redujo los niveles de UCP1 en el BAT mientras que el uso de leptina exógena produjo un aumento, que no se tradujo en un aumento de la temperatura corporal, excepto cuando la dosis se elevó a 2 mg/ml^{-1} . Es más, el uso de la dosis estándar de leptina redujo la temperatura corporal en ratas expuestas a una temperatura ambiente de 21°C , en el caso de los animales que no habían estabilizado la actividad durante la línea base.
8. La elevación de la temperatura ambiente tuvo efectos a nivel hipotalámico en el procedimiento SIH en la misma línea que en el modelo ABA: revertió la sobreexpresión de MC4R y AgRP, pero por el contrario produjo un aumento de la expresión de POMC. También se produjo un aumento de la expresión de CART.

Es importante destacar de las anteriores conclusiones el hecho de que absolutamente todos los animales expuestos a la elevación de la TA redujeron la actividad en la rueda, a niveles inferiores a los desarrollados durante la línea base, mientras que la leptina no redujo, en ningún caso, el incremento de la actividad. Además, el aumento de la TA permite que el 100% de los animales frenen la pérdida de peso, frente al 0% de los animales tratados con leptina. Este hecho se da continuamente independientemente de la dosis o el tipo de leptina empleada, o que la actividad de línea base fuera estabilizada o no.

En relación con el estudio realizado con animales alimentados ad libitum y acceso a rueda de actividad, también podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. El uso de leptina exógena aumentó la actividad media diaria de los animales con alimentación ad libitum que se relaciona con un aumento en la proporción de actividad diurna con respecto a la actividad media total. Este aumento en la proporción de actividad diurna fue más significativo con la dosis estándar.
2. El uso de leptina exógena redujo la ingesta en ratas alimentadas ad libitum sin afectar a la ganancia de peso corporal, ya que todos los animales aumentaron el peso corporal por igual, independientemente de si fueron tratados con leptina o vehículo.
3. El uso de leptina exógena produjo un aumento de los niveles de UCP1 en el BAT que no se tradujo en un aumento de la temperatura corporal.

Por último, las conclusiones referidas al empleo del modelo ABA son las siguientes:

1. La elevación de la temperatura ambiente revertió la hipotermia que produce la exposición al modelo ABA a niveles fisiológicos, sin producir hipertermia.
2. La restricción de alimento produjo una reducción del programa termogénico, que fue menos pronunciado que con la elevación de la temperatura ambiente, tanto en ratas Activas como Inactivas.

3. El sensor energético AMPK no está implicado en la regulación de la termogénesis ni en la regulación de la ingesta en el modelo ABA.
4. Otras vías que regulan el balance energético, como la vía UPR y la ruta de mTOR, no parecen estar implicadas en la regulación del balance energético de ratas sometidas al modelo ABA.
5. La situación metabólica de las ratas sometidas a ABA parece estar regulada por FAS, independientemente de AMPK.
6. La exposición a ABA produce inflamación hipotalámica, reducción de marcadores lipogénicos y lipolíticos en WAT, aumento de los marcadores de caquexia en músculo, reducción de los niveles de glucógeno hepático, la reducción de los niveles circulantes de leptina y aumento de los niveles de corticosterona en sangre.
7. La elevación de la temperatura ambiente revierte las consecuencias sufridas por las ratas expuestas al modelo ABA en el hipotálamo y en los diferentes tejidos periféricos.

La realización de esta Tesis Doctoral supone la aportación de más evidencia empírica al efecto beneficioso del calor sobre diferentes modelos animales análogos de la anorexia nerviosa. Así, el aumento de la temperatura ambiente permite recuperar el peso corporal de los animales gracias al efecto inhibitorio sobre el programa termogénico que da lugar a una mejor preservación energética, ya que los animales no necesitan generar calor para contrarrestar la hipotermia. De hecho, es necesario destacar que estos estudios suponen la demostración por primera vez en la literatura de que el calor previene, en el modelo SIH, y revierte, en el modelo ABA, la hipotermia, reforzando la teoría termorregulatoria de la hiperactividad. Además, el papel de la hipotermia como un aspecto importante en el fenómeno ABA, es coherente con resultados obtenidos con tratamientos que frenan también el desarrollo de la actividad física y conllevan asociado, o bien un aumento de la temperatura corporal, o bien una inhibición de la hipotermia. Este sería el caso de la administración ICV de AgRP, del agonista inverso del receptor de melanocortinas MC4 (Hillebrand, Kas, Scheurink, van Dijk, & Adan, 2006) o de la administración periférica de olanzapina, un antipsicótico atípico (Hillebrand, van Elburg, Kas, van Engeland, & Adan, 2005c). Por otro lado, la leptina siempre se ha considerado una hormona termogénica debido a que la ausencia de leptina se asociaba con hipotermia e inactivación del tejido adiposo pardo y su administración estimula este tejido y aumenta la temperatura corporal. Pero recientemente, dos publicaciones refutan esta idea y proponen que el aumento de la temperatura corporal no se debe a un aumento en la termogénesis sino a otros mecanismos, como la reducción de la conductancia térmica (Kaiyala, Ogimoto, Nelson, Muta, & Morton, 2016) y la disminución de la disipación del calor por la cola (Fischer et al., 2016), lo que permitiría retener mejor la temperatura corporal sin necesidad de activar la termogénesis adaptativa.

Por lo tanto, si bien manteníamos inicialmente que tanto el efecto de la leptina como del calor sobre el balance energético estaban relacionados con su efecto sobre la termogénesis adaptativa, inactivándola en el caso del calor y activándola en el de la leptina, ahora parece que únicamente el calor parece estar relacionado con el gasto energético a través del tejido adiposo pardo. De todas formas, ahora surge una nueva línea de investigación que permita aclarar el mecanismo por el cual la leptina consigue aumentar la temperatura corporal sin necesidad de

activar el tejido adiposo pardo. También sería interesante centrar esfuerzos en realizar más estudios con animales no deficientes de leptina, puesto que la mayor parte de la investigación realizada en relación con este tema se hizo básicamente sobre este tipo de animales (ratones *ob/ob*, ratones *db/db* o ratas Zucker).

Debido a la imposibilidad de poder reproducir el efecto inhibitor de la leptina sobre la hiperactividad mostrado por Exner et al. (2000) y que durante casi veinte años no surgieran en la literatura trabajos replicando dicho estudio, nos hacen sospechar que este efecto de la leptina no es tan robusto como parecía en un primer momento (Stengel et al., 2017). Por el contrario, el aumento de la temperatura ambiente es el único tratamiento con un efecto beneficioso en la actividad, el peso corporal, la ingesta y la temperatura corporal que logra revertir las consecuencias de la exposición al modelo ABA. Así, el 100% de los animales sometidos a este procedimiento son recuperados, aun cuando hubieran perdido el 20% de su peso inicial, lo que supone un punto de no retorno, en el que los animales morirían si no son apartados de las condiciones de actividad y restricción de alimento, cuando son colocados a una temperatura ambiental dentro del rango de la zona termoneutral.



BIBLIOGRAFÍA





- Abbott, C. R., Rossi, M., Wren, A. M., Murphy, K. G., Kennedy, A. R., Stanley, S. A., ... Bloom, S. R. (2001). Evidence of an orexigenic role for cocaine- and amphetamine-regulated transcript after administration into discrete hypothalamic nuclei. *Endocrinology*, *142*(8), 3457–3463. <https://doi.org/10.1210/endo.142.8.8304>
- Abraham, S. F., Pettigrew, B., Boyd, C., & Russell, J. (2006). Predictors of functional and exercise amenorrhoea among eating and exercise disordered patients. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *21*(1), 257–261. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei294>
- Abraham, S. F., Pettigrew, B., Boyd, C., Russell, J., & Taylor, A. (2005). Usefulness of amenorrhoea in the diagnoses of eating disorder patients. *Journal of Psychosomatic Obstetrics and Gynaecology*, *26*(3), 211–215.
- Adan, R. H., Hillebrand, J. G., de Rijke, C., Nijenhuis, W., Vink, T., Garner, K., & Kas, M. H. (2003). Melanocortin System and Eating Disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *994*(1), 267–274. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb03189.x>
- Afonso, V. M., & Eikelboom, R. (2003). Relationship between wheel running, feeding, drinking, and body weight in male rats. *Physiology & Behavior*, *80*(1), 19–26. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(03\)00216-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9384(03)00216-6)
- Agras, W. (1987). Eating disorders: Management of obesity, bulimia and anorexia nervosa. In *Oxford, UK, Pergamon*.
- Ahima, R. S., Prabakaran, D., Mantzoros, C., Qu, D., Lowell, B., Maratos-Flier, E., & Flier, J. S. (1996). Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, *382*(6588), 250.
- Alexander, G. (1939). Anorexia nervosa, *12*, 189–195.
- Altemus, M., Glowa, J. R., Galliven, E., Leong, Y.-M., & Murphy, D. L. (1996). Effects of serotonergic agents on food-restriction-induced hyperactivity. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *53*(1), 123–131. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)02003-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0091-3057(95)02003-9)
- Alvarez-Crespo, M., Martinez-Sanchez, N., Ruiz-Pino, F., Garcia-Lavandeira, M., Alvarez, C. V., Tena-Sempere, M., ... Lopez, M. (2013). The orexigenic effect of orexin-A revisited: dependence of an intact growth hormone axis. *Endocrinology*, *154*(10), 3589–3598. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1251>
- American Psychiatric Association. (1980). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*, (3a. ed.). Washington, DC: APA.
- American Psychiatric Association. (1987). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*, (3a. ed. rev.). Washington, DC: APA.
- American Psychiatric Association. (2000). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*, (4a. ed. rev.). Washington, DC: APA.
- American Psychiatric Association. (2006). Practice guideline for the treatment of patients with eating disorders (revision). *The American Journal of Psychiatry*, *157*(1), 1.
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®)*. Washington, DC.

- Andersen, R. E., Crespo, C. J., Bartlett, S. J., Cheskin, L. J., & Pratt, M. (1998). Relationship of Physical Activity and Television Watching With Body Weight and Level of Fatness Among Children Results From the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA*, *279*(12), 938–942. <https://doi.org/10.1001/jama.279.12.938>
- Andersen, S. B., Lindgreen, P., Rokkedal, K., & Clausen, L. (2018). Grasping the weight cut-off for anorexia nervosa in children and adolescents. *International Journal of Eating Disorders*, *51*(12), 1346–1351. <https://doi.org/10.1002/eat.22977>
- Anderson, K. A., Ribar, T. J., Lin, F., Noeldner, P. K., Green, M. F., Muehlbauer, M. J., ... Means, A. R. (2008). Hypothalamic CaMKK2 contributes to the regulation of energy balance. *Cell Metabolism*, *7*(5), 377–388. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.02.011>
- Andersson, U., Filipsson, K., Abbott, C. R., Woods, A., Smith, K., Bloom, S. R., ... Small, C. J. (2004). AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(13), 12005–12008. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300557200>
- Andries, A., Gram, B., & Støving, R. K. (2015). Effect of dronabinol therapy on physical activity in anorexia nervosa: a randomised, controlled trial. *Eating and Weight Disorders - Studies on Anorexia, Bulimia and Obesity*, *20*(1), 13–21. <https://doi.org/10.1007/s40519-014-0132-5>
- Aponte, Y., Atasoy, D., & Sternson, S. M. (2011). AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nature Neuroscience*, *14*(3), 351–355. <https://doi.org/10.1038/nn.2739>
- Arase, K., York, D. A., Shimizu, H., Shargill, N., & Bray, G. A. (1988). Effects of corticotropin-releasing factor on food intake and brown adipose tissue thermogenesis in rats. *The American Journal of Physiology*, *255*(3 Pt 1), E255-9. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1988.255.3.E255>
- Aravich, P. F., Rieg, T. S., Lauterio, T. J., & Doerries, L. E. (1993). β -endorphin and dynorphin abnormalities in rats subjected to exercise and restricted feeding: relationship to anorexia nervosa? *Brain Research*, *622*(1), 1–8. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90794-N](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90794-N)
- Arcelus, J., AJ, M., Wales, J., & Nielsen, S. (2011). Mortality rates in patients with anorexia nervosa and other eating disorders: A meta-analysis of 36 studies. *Archives of General Psychiatry*, *68*(7), 724–731. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2011.74>
- Argilés, J. M., Moore-Carrasco, R., Fuster, G., Busquets, S., & López-Soriano, F. J. (2003). Cancer cachexia: the molecular mechanisms. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *35*(4), 405–409. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00251-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00251-0)
- Arun, C. P. (2008). Drive for Leanness, Anorexia Nervosa, and Overactivity: The Missing Link. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1148*(1), 526–529. <https://doi.org/10.1196/annals.1410.055>
- Asnicar, M. A., Smith, D. P., Yang, D. D., Heiman, M. L., Fox, N., Chen, Y. F., ... Koster, A. (2001). Absence of cocaine- and amphetamine-regulated transcript results in obesity in

- mice fed a high caloric diet. *Endocrinology*, 142(10), 4394–4400. <https://doi.org/10.1210/endo.142.10.8416>
- Atasoy, D., Betley, J. N., Su, H. H., & Sternson, S. M. (2012). Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature*, 488(7410), 172–177. <https://doi.org/10.1038/nature11270>
- Attia, E., Becker, A. E., Bryant-Waugh, R., Hoek, H. W., Kreipe, R. E., Marcus, M. D., ... Wonderlich, S. (2013). Feeding and eating disorders in DSM-5. *The American Journal of Psychiatry*, 170(11), 1237–1239. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2013.13030326>
- Attia, E., Marcus, M. D., Walsh, B. T., & Guarda, A. S. (2017). The need for consistent outcome measures in eating disorder treatment programs: A proposal for the field. *International Journal of Eating Disorders*, 50(3), 231–234. <https://doi.org/10.1002/eat.22665>
- Attia, E., & Roberto, C. A. (2009). Should amenorrhea be a diagnostic criterion for anorexia nervosa? *International Journal of Eating Disorders*, 42(7), 581–589. <https://doi.org/10.1002/eat.20720>
- Attia, E., & Walsh, B. T. (2009). Behavioral Management for Anorexia Nervosa. *New England Journal of Medicine*, 360(5), 500–506. <https://doi.org/10.1056/NEJMct0805569>
- Bachrach, A., Erwin, W. J. y Mohr, J. P. The Control of Eating Behavior in an Anorexic by Operant Conditioning Techniques. En L. Ullmann y L. P. Krasner [Eds.], "Case Studies in Behavior Modification." New York: Holt, Rinehart, and Winston, 1965, pp. 153-163.
- Bailey, S. M., Udoh, U. S., & Young, M. E. (2014). Circadian regulation of metabolism. *Journal of Endocrinology*, 222(2), R75–R96. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0200>
- Baker, M. (2011). Inside the minds of mice and men. *Nature*, 475, 123. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/475123a>
- Bamshad, M., Song, C. K., & Bartness, T. J. (1999). CNS origins of the sympathetic nervous system outflow to brown adipose tissue. *The American Journal of Physiology*, 276(6), R1569–78. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1999.276.6.R1569>
- Ban, T. A. (2006). The role of serendipity in drug discovery. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 8(3), 335–344. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17117615>
- Barazzoni, R., Zanetti, M., Stebel, M., Biolo, G., Cattin, L., & Guarnieri, G. (2003). Hyperleptinemia prevents increased plasma ghrelin concentration during short-term moderate caloric restriction in rats. *Gastroenterology*, 124(5), 1188–1192. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)00281-6](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)00281-6)
- Barboriak, J. J., Wilson, A. S., Schulte, W. J., & Knoblock, H. W. J. R. (1972). Running Activity and Gastric ulcers in the rat. *Experimentia*, 28, 1179–1180.
- Barsh, G. S., & Schwartz, M. W. (2002). Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nature Reviews Genetics*, 3, 589. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nrg862>
- Barzilai, N., Wang, J., Massilon, D., Vuguin, P., Hawkins, M., & Rossetti, L. (1997). Leptin selectively decreases visceral adiposity and enhances insulin action. *The Journal of clinical investigation*, 100(12), 3105–3110.

- Baskin, D. G., Breininger, J. F., & Schwartz, M. W. (1999). Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes*, 48(4), 828 LP-833. <https://doi.org/10.2337/diabetes.48.4.828>
- Baudrand B, R., Arteaga U, E., & Moreno G, M. (2010). [Adipose tissue as an endocrine modulator: hormonal changes associated with obesity]. *Revista medica de Chile*, 138(10), 1294–1301. <https://doi.org/S0034-98872010001100015>
- Bauer, M. S. (1990). Intensity and precision of circadian wheel running in three outbred rat strains. *Physiology & Behavior*, 47(2), 397–401. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9384\(90\)90162-W](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90162-W)
- Beck, B., Jhanwar-Uniyal, M., Burlet, A., Chapleur-Chateau, M., Leibowitz, S. F., & Burlet, C. (1990). Rapid and localized alterations of neuropeptide Y in discrete hypothalamic nuclei with feeding status. *Brain Research*, 528(2), 245–249.
- Becker, A. E., Eddy, K. T., & Perloe, A. (2009). Clarifying criteria for cognitive signs and symptoms for eating disorders in DSM-V. *International Journal of Eating Disorders*, 42(7), 611–619. <https://doi.org/10.1002/eat.20723>
- Becker, A. E., Thomas, J. J., & Pike, K. M. (2009). Should non-fat-phobic anorexia nervosa be included in DSM-V? *International Journal of Eating Disorders*, 42(7), 620–635. <https://doi.org/10.1002/eat.20727>
- Beijer, E., Schoenmakers, J., Vijgen, G., Kessels, F., Dingemans, A.-M., Schrauwen, P., ... Brans, B. (2012). A role of active brown adipose tissue in cancer cachexia? *Oncology Reviews*, 6(1), e11. <https://doi.org/10.4081/oncol.2012.e11>
- Beiroa, D., Imbernon, M., Gallego, R., Senra, A., Herranz, D., Villarroya, F., ... Nogueiras, R. (2014). GLP-1 agonism stimulates brown adipose tissue thermogenesis and browning through hypothalamic AMPK. *Diabetes*, 63(10), 3346–3358. <https://doi.org/10.2337/db14-0302>
- Bellinger, L. L., & Bernardis, L. L. (2002). The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: lessons learned from lesioning studies. *Physiology & Behavior*, 76(3), 431–442.
- Bergh, C., Brodin, U., Lindberg, G., & Södersten, P. (2002). Randomized controlled trial of a treatment for anorexia and bulimia nervosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(14), 9486 LP-9491. <https://doi.org/10.1073/pnas.142284799>
- Bergh, C., & Södersten, P. (1998). Anorexia nervosa: rediscovery of a disorder. *The Lancet*, 351(9113), 1427–1429. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)12033-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)12033-5)
- Berkman, J. M. (1930). Anorexia Nervosa, Anorexia, Inanition, and Low Basal Metabolic Rate. *American Journal of the Medical Sciences*, 180, 411–424.
- Berkman, J. M. (1939). Functional Anorexia and Functional Vomiting: Their Relation to Anorexia Nervosa. *Medical Clinics of North America*, 23(4), 901–912. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0025-7125\(16\)36834-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0025-7125(16)36834-1)
- Berkman, J. M. (1944). Anorexia Nervosa: The diagnosis and treatment of inanition resulting from functional Disorders. *Annals of Internal Medicine*, 22, 679–691.

- Berkman, N. D., Lohr, K. N., & Bulik, C. M. (2007). Outcomes of eating disorders: A systematic review of the literature. *International Journal of Eating Disorders*, 40(4), 293–309. <https://doi.org/10.1002/eat.20369>
- Bernardis, L. L. (1970). Participation of the dorsomedial hypothalamic nucleus in the “feeding center” and water intake circuitry of the weanling rat. *Journal of Neuro-Visceral Relations*, 31(4), 387–398.
- Bernardis, L. L. (1972). Hypophagia, hypodipsia, and hypoactivity following electrolytic lesions in the dorsomedial hypothalamic nuclei of mature rats of both sexes. *Journal of Neural Transmission*, 33(1), 1–10.
- Beumont, P. J. V. (1998). The behavioural disturbance, psychopathology, and phenomenology of eating disorders. En H. W. Hoek, J. L. Treasure y M. A. Katzman (Eds.), *Neurobiology in the treatment of Eating Disorder* (pp. 27-46). Chichester, England: Wiley.
- Beumont, P. J. V., Booth, A. L., Abraham, S. F., Griffiths, D. A. & Turner, T. R. (1983). A temporal sequence of symptoms in patients with anorexia nervosa: A preliminary report. En P. L. Darby, P. E. Garfinkel, D. M. Garner & D. V. Coscina (Eds.), *Anorexia Nervosa: Recent developments in research* (pp. 129-136). New York: Alan R. Liss.
- Bhanji, S., & Thompson, J. (1974). Operant Conditioning in the Treatment of Anorexia Nervosa: A Review and Retrospective Study of 11 Cases. *British Journal of Psychiatry*, 124(579), 166–172. <https://doi.org/DOI:10.1192/bjp.124.2.166>
- Bi, S., Kim, Y. J., & Zheng, F. (2012). Dorsomedial hypothalamic NPY and energy balance control. *Neuropeptides*, 46(6), 309–314. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2012.09.002>
- Bing, C., Russell, S., Becket, E., Pope, M., Tisdale, M. J., Trayhurn, P., & Jenkins, J. R. (2006). Adipose atrophy in cancer cachexia: morphologic and molecular analysis of adipose tissue in tumour-bearing mice. *British Journal of Cancer*, 95(8), 1028–1037. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603360>
- Bing, C., & Trayhurn, P. (2009). New insights into adipose tissue atrophy in cancer cachexia. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 68(4), 385–392. <https://doi.org/10.1017/S0029665109990267>
- Birmingham, C. L., Gutierrez, E., Jonat, L., & Beumont, P. (2004). Randomized controlled trial of warming in anorexia nervosa. *International Journal of Eating Disorders*, 35(2), 234–238. <https://doi.org/10.1002/eat.10246>
- Bittencourt, J. C., Presse, F., Arias, C., Peto, C., Vaughan, J., Nahon, J. L., ... Sawchenko, P. E. (1992). The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *The Journal of Comparative Neurology*, 319(2), 218–245. <https://doi.org/10.1002/cne.903190204>
- Blache, D., Tellam, R. L., Chagas, L. M., Blackberry, M. A., Vercoe, P. E., & Martin, G. B. (2000). Level of nutrition affects leptin concentrations in plasma and cerebrospinal fluid in sheep. *The Journal of Endocrinology*, 165(3), 625–637.
- Blinder, B. J., Freeman, D. M. A., & Stunkard, A. J. (1970). Behavior Therapy of Anorexia Nervosa: Effectiveness of Activity as a Reinforcer of Weight Gain. *American Journal of Psychiatry*, 126(8), 1093–1098. <https://doi.org/10.1176/ajp.126.8.1093>

- Bolles, R. C., & Duncan, P. M. (1969). Daily course of activity and subcutaneous body temperature in hungry and thirsty rats. *Physiology & Behavior*, 4(1), 87–89. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9384\(69\)90018-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9384(69)90018-3)
- Bosy-Westphal, A., Nutzinger, D. O., Brabant, G., Klein, H., Hauer, M., Onur, S., ... Müller, M. J. (2005). Leptin and body weight regulation in patients with anorexia nervosa before and during weight recovery. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(4), 889–896. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.4.889>
- Boyer, P. D. (1997). The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annual Review of Biochemistry*, 66, 717–749. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.717>
- Bradford, M. M. (1976). An improved colorimetric technique for protein measurement. *Anal. Biochem*, 72, 348-354.
- Bratland-Sanda, S., Sundgot-Borgen, J., Ro, O., Rosenvinge, J. H., Hoffart, A., & Martinsen, E. W. (2010). “I’m not physically active - I only go for walks”: physical activity in patients with longstanding eating disorders. *The International Journal of Eating Disorders*, 43(1), 88–92. <https://doi.org/10.1002/eat.20753>
- Bredella, M. A., Ghomi, R. H., Thomas, B. J., Torriani, M., Brick, D. J., Gerweck, A. V., ... Miller, K. K. (2010). Comparison of DXA and CT in the assessment of body composition in premenopausal women with obesity and anorexia nervosa. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 18(11), 2227–2233. <https://doi.org/10.1038/oby.2010.5>
- Broadwell, R. D., & Brightman, M. W. (1976). Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral and cerebral blood. *The Journal of Comparative Neurology*, 166(3), 257–283. <https://doi.org/10.1002/cne.901660302>
- Brobeck, J. R. (1945). Effect of variations in activity, food intake and environmental temperature on weight gain in the albino rat. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 143(1), 1–5. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1945.143.1.1>
- Brobeck, J. R. (1948). Food intake as a mechanism of temperature regulation. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 20(6), 545–552. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18872321>
- Brobeck J. R. (1960). Food and temperature. En G. Pincus (Ed.), *Recent progress in hormone research* (pp.439-459). New York: Academic
- Brockmeyer, T., Friederich, H.-C., & Schmidt, U. (2018). Advances in the treatment of anorexia nervosa: a review of established and emerging interventions. *Psychological Medicine*, 48(8), 1228–1256. <https://doi.org/DOI: 10.1017/S0033291717002604>
- Broocks, A., Liu, J., & Pirke, K. M. (1990). Semistarvation-induced hyperactivity compensates for decreased norepinephrine and dopamine turnover in the mediobasal hypothalamus of the rat. *Journal of Neural Transmission. General Section*, 79(1–2), 113–124.
- Bruch, H. (1961). Conceptual confusion in eating disorders. *Journal of Nervous and Mental Disease*, 133, 46–54.
- Bruch, H. (1966). Anorexia nervosa and its differential diagnosis. *The Journal of Nervous and Mental Disease*, 141, 555–566.

- Bruch, H. (1969). Hunger and instinct. *The Journal of Nervous and Mental Disease*, 149, 91–114.
- Bruch, H. (1970a). Changing approaches to anorexia nervosa. *International Psychiatry Clinics*, 7(1), 3–24.
- Bruch, H. (1970b). Psychotherapy in primary anorexia nervosa. *The Journal of Nervous and Mental Disease*, 150(1), 51–67.
- Bruch, H. (1973). Eating Disorders: Obesity, anorexia nervosa and the person within. In *New York: Basic Books*.
- Bruch, H. (1974). *Eating disorders. Obesity, anorexia nervosa, and the person within*. London: Routledge & Kegan Paul.
- Bruch, H. (1962). Perceptual and conceptual disturbances in anorexia nervosa. *Psychosomatic Medicine*, 24, 187–194.
- Bruch, H. (1982). Anorexia nervosa: therapy and theory. *The American Journal of Psychiatry*, 139 (12), 1531-1538.
- Bruchner, W. ., Wies, C. ., & Laviertes, P. . (1938). Anorexia nervosa and pituitary cachexia. *American Journal of Medicine*, 196, 663–672.
- Brumberg, J. J. (1985). “Fasting girls”: reflections on writing the history of anorexia nervosa. *Monographs of the Society for Research in Child Development*, 50(4–5), 93–104.
- Bulik, C. M., Berkman, N. D., Brownley, K. A., Sedway, J. A., & Lohr, K. N. (2007). Anorexia nervosa treatment: A systematic review of randomized controlled trials. *International Journal of Eating Disorders*, 40(4), 310–320. <https://doi.org/10.1002/eat.20367>
- Bulik, C. M., Sullivan, P. F., & Kendler, K. S. (2000). An empirical study of the classification of eating disorders. *The American Journal of Psychiatry*, 157(6), 886–895. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.157.6.886>
- Button, E. J., Chadalavada, B., & Palmer, R. L. (2010). Mortality and predictors of death in a cohort of patients presenting to an eating disorders service. *International Journal of Eating Disorders*, 43(5), 387–392. <https://doi.org/10.1002/eat.20715>
- Byford, S., Barrett, B., Roberts, C., Clark, A., Edwards, V., Smethurst, N., & Gowers, S. G. (2007). Economic evaluation of a randomised controlled trial for anorexia nervosa in adolescents. *The British Journal of Psychiatry : The Journal of Mental Science*, 191, 436–440. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.107.036806>
- Cachelin, F. M., & Maher, B. A. (1998). Is amenorrhea a critical criterion for anorexia nervosa? *Journal of Psychosomatic Research*, 44(3–4), 435–440.
- Campbell, P. G. (1995). What would a causal explanation of the eating disorders look like? En G. Szmuckler, C. Dare y J. Treasure (Eds.), *Handbook of eating disorders: Theory, treatment and research* (pp. 49-64). Chichester, England: Wiley.
- Campbell, B. A., & Lynch, G. S. (1967). Activity and thermoregulation during food deprivation in the rat. *Physiology & Behavior*, 2(3), 311–313. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9384\(67\)90085-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9384(67)90085-6)

- Campbell, B. A., & Lynch, G. S. (1968). Influence of hunger and thirst on the relationship between spontaneous activity and body temperature. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *65*, 492–498.
- Campbell, L. F., & Bedi, K. S. (1989). The effects of undernutrition during early life on spatial learning. *Physiology & Behavior*, *45*(5), 883–890. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(89\)90210-2](https://doi.org/10.1016/0031-9384(89)90210-2)
- Campfield, L. A., Smith, F. J., Guisez, Y., Devos, R., & Burn, P. (1995). Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*, *269*(5223), 546–549. DOI: 10.1126/science.7624778
- Cannon, B., & Nedergaard, J. (2017). What Ignites UCP1? *Cell Metabolism*, *26*(5), 697–698. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.10.012>
- Cannon, B., & Nedergaard, J. A. N. (2004). Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiological Reviews*, *84*(1), 277–359. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2003>
- Carling, D., Sanders, M. J., & Woods, A. (2008). The regulation of AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *International Journal of Obesity (2005)*, *32 Suppl 4*, S55-9. <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.124>
- Carling, D., Thornton, C., Woods, A., & Sanders, M. J. (2012). AMP-activated protein kinase: new regulation, new roles? *The Biochemical Journal*, *445*(1), 11–27. <https://doi.org/10.1042/BJ20120546>
- Carling, D., Zammit, V. A., & Hardie, D. G. (1987). A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Letters*, *223*(2), 217–222.
- Carrera, O. (2007). *Apego y Anorexia Nerviosa: Manipulación de las experiencias tempranas en ratas y desempeño en el procedimiento experimental de Anorexia Basada en la Actividad*. Universidad de Santiago de Compostela.
- Carrera, O., Adan, R. A. H., Gutierrez, E., Danner, U. N., Hoek, H. W., van Elburg, A. A., & Kas, M. J. H. (2012). Hyperactivity in Anorexia Nervosa: Warming Up Not Just Burning-Off Calories. *PLOS ONE*, *7*(7), e41851. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041851>
- Carrera, O., Fraga, Á., Pellón, R., & Gutiérrez, E. (2014). Rodent Model of Activity-Based Anorexia. *Current Protocols in Neuroscience*, *67*(1), 9.47.1–9.47.11. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0947s67>
- Carter, J. C., McFarlane, T. L., Bewell, C., Olmsted, M. P., Woodside, D. B., Kaplan, A. S., & Crosby, R. D. (2009). Maintenance treatment for anorexia nervosa: A comparison of cognitive behavior therapy and treatment as usual. *International Journal of Eating Disorders*, *42*(3), 202–207. <https://doi.org/10.1002/eat.20591>
- Casper, R. C. (1998). Behavioral activation and lack of concern, core symptoms of anorexia nervosa? *International Journal of Eating Disorders*, *24*(4), 381–393. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-108X\(199812\)24:4<381::AID-EAT5>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-108X(199812)24:4<381::AID-EAT5>3.0.CO;2-Q)
- Casper, R. C. (2006). The ‘drive for activity’ and “restlessness” in anorexia nervosa: Potential

- pathways. *Journal of Affective Disorders*, 92(1), 99–107. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jad.2005.12.039>
- Casper, R. C., Sullivan, E. L., & Tecott, L. (2008). Relevance of animal models to human eating disorders and obesity. *Psychopharmacology*, 199(3), 313–329. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1102-2>
- Cerrato, M. (2010). *Efecto modulador de la temperatura ambiental en el modelo animal de Anorexia Basada en la Actividad: Implicaciones para el tratamiento de la anorexia nerviosa*. Universidad de Santiago de Compostela.
- Cerrato, M., Carrera, O., Vazquez, R., Echevarría, E., & Gutierrez, E. (2012). Heat makes a difference in activity-based anorexia: A translational approach to treatment development in anorexia nervosa. *International Journal of Eating Disorders*, 45(1), 26–35. <https://doi.org/10.1002/eat.20884>
- Chan, J., Lutz, K., Cochran, E., Huang, W., Peters, Y., Weyer, C., & Gorden, P. (2011). Clinical Effects of Long-Term Metreleptin Treatment in Patients with Lipodystrophy. *Endocrine Practice*, 17(6), 922–932. <https://doi.org/10.4158/EP11229.OR>
- Chen, Y., & Heiman, M. L. (2000). Chronic leptin administration promotes lipid utilization until fat mass is greatly reduced and preserves lean mass of normal female rats. *Regulatory peptides*, 92(1-3), 113-119. [https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(00\)00157-9](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(00)00157-9)
- Cheung, C. C., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (1997). Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology*, 138(10), 4489-4492. <https://doi.org/10.1210/endo.138.10.5570>
- Cheung, C. C., Kurrasch, D. M., Liang, J. K., & Ingraham, H. A. (2013). Genetic labeling of steroidogenic factor-1 (SF-1) neurons in mice reveals ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH) circuitry beginning at neurogenesis and development of a separate non-SF-1 neuronal cluster in the ventrolateral VMH. *Journal of Comparative Neurology*, 521(6), 1268–1288. <https://doi.org/10.1002/cne.23226>
- Choi, Y. H., Li, C. L., Hartzell, D. L., Della-Fera, M. A., & Baile, C. A. (2003). Central effects of rat versus mouse leptin: ingestive behavior and adipose apoptosis. *Domestic animal endocrinology*, 25(3), 295-301. [https://doi.org/10.1016/S0739-7240\(03\)00058-4](https://doi.org/10.1016/S0739-7240(03)00058-4)
- Choi, Y.-H., Fujikawa, T., Lee, J., Reuter, A., & Kim, K. W. (2013). Revisiting the Ventral Medial Nucleus of the Hypothalamus: The Roles of SF-1 Neurons in Energy Homeostasis. *Frontiers in Neuroscience*. Retrieved from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2013.00071>
- Choi, Y. H., Li, C., Hartzell, D. L., Little, D. E., Della-Fera, M. A., & Baile, C. A. (2008). ICV leptin effects on spontaneous physical activity and feeding behavior in rats. *Behavioural brain research*, 188(1), 100-108. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.10.024>
- Chossat, C. (1843). Recherches expérimentales sur l'inanition. *Sciences Mathématiques et Physiques*, 8, 438–640.
- Claret, M., Smith, M. A., Knauf, C., Al-Qassab, H., Woods, A., Heslegrave, A., ... Withers, D. J. (2011). Deletion of Lkb1 in pro-opiomelanocortin neurons impairs peripheral glucose homeostasis in mice. *Diabetes*, 60(3), 735–745. <https://doi.org/10.2337/db10-1055>

- Clark, J. T., Kalra, P. S., Crowley, W. R., & Kalra, S. P. (1984). Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology*, *115*(1), 427–429. <https://doi.org/10.1210/endo-115-1-427>
- Clarke, T. K., Weiss, A. R. D., & Berrettini, W. H. (2012). The Genetics of Anorexia Nervosa. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, *91*(2), 181–188. <https://doi.org/10.1038/clpt.2011.253>
- Clifford, G. M., Londos, C., Kraemer, F. B., Vernon, R. G., & Yeaman, S. J. (2000). Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(7), 5011–5015.
- Clifton, D. K., Steiner, R. A., & Cheung, C. C. (1997). Proopiomelanocortin Neurons Are Direct Targets for Leptin in the Hypothalamus. *Endocrinology*, *138*(10), 4489–4492. <https://doi.org/10.1210/endo.138.10.5570>
- Cochran, E., Gorden, P., Diker-Cohen, T., & Brown, R. J. (2015). Partial and Generalized Lipodystrophy: Comparison of Baseline Characteristics and Response to Metreleptin. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *100*(5), 1802–1810. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-4491>
- Coëffier, M., Achamrah, N., & Déchelotte, P. (2016). Physical activity in patients with anorexia nervosa. *Nutrition Reviews*, *74*(5), 301–311. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuw001>
- Collier, G., & Hirsch, E. (1971). Reinforcing properties of spontaneous activity in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. US: American Psychological Association. <https://doi.org/10.1037/h0031588>
- Commins, S. P., Watson, P. M., Levin, N., Beiler, R. J., & Gettys, T. W. (2000). Central leptin regulates the UCP1 and ob genes in brown and white adipose tissue via different beta-adrenoceptor subtypes. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(42), 33059–33067. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006328200>
- Cone, R. D. (2005). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nature Neuroscience*, *8*(5), 571–578. <https://doi.org/10.1038/nn1455>
- Considine, R. V., Sinha, M. K., Heiman, M. L., Kriauciunas, A., Stephens, T. W., Nyce, M. R., ... Bauer, T. L. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *The New England Journal of Medicine*, *334*(5), 292–295. <https://doi.org/10.1056/NEJM199602013340503>
- Contreras, C., Gonzalez-Garcia, I., Martinez-Sanchez, N., Seoane-Collazo, P., Jacas, J., Morgan, D. A., ... Lopez, M. (2014). Central ceramide-induced hypothalamic lipotoxicity and ER stress regulate energy balance. *Cell Reports*, *9*(1), 366–377. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.057>
- Contreras, C., Gonzalez-Garcia, I., Seoane-Collazo, P., Martinez-Sanchez, N., Linares-Pose, L., Rial-Pensado, E., ... Lopez, M. (2017). Reduction of Hypothalamic Endoplasmic Reticulum Stress Activates Browning of White Fat and Ameliorates Obesity. *Diabetes*, *66*(1), 87–99. <https://doi.org/10.2337/db15-1547>
- Contreras, C., Gonzalez, F., Fernø, J., Diéguez, C., Rahmouni, K., Nogueiras, R., & López, M. (2015). The brain and brown fat. *Annals of Medicine*, *47*(2), 150–168.

<https://doi.org/10.3109/07853890.2014.919727>

- Contreras, C., Nogueiras, R., Diéguez, C., Medina-Gómez, G., & López, M. (2016). Hypothalamus and thermogenesis: Heating the BAT, browning the WAT. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *438*, 107–115. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.08.002>
- Contreras, C., Nogueiras, R., Dieguez, C., Rahmouni, K., & Lopez, M. (2017). Traveling from the hypothalamus to the adipose tissue: The thermogenic pathway. *Redox Biology*, *12*, 854–863. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.019>
- Copeland, P. M., Sacks, N. R., & Herzog, D. B. (1995). Longitudinal follow-up of amenorrhea in eating disorders. *Psychosomatic Medicine*, *57*(2), 121–126.
- Coscina, D. V. y Garfinkel, P. E. (1991). Animal models of eating disorders: A clinical perspective. En P. Willner (Ed.), *Behavioural models of psychopharmacology: Theoretical, industrial and clinical perspectives* (pp. 237-250). Cambridge: Cambridge University Press.
- Costanzo-Garvey, D. L., Pfluger, P. T., Dougherty, M. K., Stock, J. L., Boehm, M., Chaika, O., ... Lewis, R. E. (2009). KSR2 is an essential regulator of AMP kinase, energy expenditure, and insulin sensitivity. *Cell Metabolism*, *10*(5), 366–378. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.09.010>
- Cota, D., Proulx, K., Smith, K. A. B., Kozma, S. C., Thomas, G., Woods, S. C., & Seeley, R. J. (2006). Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science (New York, N.Y.)*, *312*(5775), 927–930. <https://doi.org/10.1126/science.1124147>
- Cowley, M. A., Pronchuk, N., Fan, W., Dinulescu, D. M., Colmers, W. F., & Cone, R. D. (1999). Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. *Neuron*, *24*(1), 155–163.
- Cowley, M. A., Smart, J. L., Rubinstein, M., Cerdán, M. G., Diano, S., Horvath, T. L., ... Low, M. J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, *411*, 480. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/35078085>
- Crisp, A. H. (1965). Clinical and therapeutic aspects of anorexia nervosa: A study of 30 cases. *Journal of Psychosomatic Research*. Netherlands: Elsevier Science. [https://doi.org/10.1016/0022-3999\(65\)90013-9](https://doi.org/10.1016/0022-3999(65)90013-9)
- Crisp, A. H. (1970). Anorexia Nervosa 'Feeding Disorder', 'Nervous Malnutrition' or 'Weight Phobia'? In *World Review of Nutrition and Dietetics* (pp. 452–504). <https://doi.org/10.1159/000387594>
- Crisp, A. H. (1985). Arousal, physical activity, and energy balance in eating and body weight and shape disorders. *International Journal of Eating Disorders*, *4*(4), 627–649. <https://doi.org/10.1002/eat.2260040422>
- Cross, E. S. (1939). The diagnosis and treatment of anorexia nervosa. En J. Nemiah, (1958). *Anorexia nervosa: Fact and Theory. American Journal of Digestive Diseases*, *3*, 249-274.
- Crow, S. J., Mitchell, J. E., Roerig, J. D., & Steffen, K. (2009). What potential role is there for medication treatment in anorexia nervosa? *International Journal of Eating Disorders*,

42(1), 1–8. <https://doi.org/10.1002/eat.20576>

- Cui, H., Lopez, M., & Rahmouni, K. (2017). The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. *Nature Reviews. Endocrinology*, 13(6), 338–351. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.222>
- Culbert, K. M., Racine, S. E., & Klump, K. L. (2015). Research Review: What we have learned about the causes of eating disorders – a synthesis of sociocultural, psychological, and biological research. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 56(11), 1141–1164. <https://doi.org/10.1111/jcpp.12441>
- Cypess, A. M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A. B., ... Kahn, C. R. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *The New England Journal of Medicine*, 360(15), 1509–1517. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810780>
- Dalamaga, M., Chou, S. H., Shields, K., Papageorgiou, P., Polyzos, S. A., & Mantzoros, C. S. (2013). Leptin at the intersection of neuroendocrinology and metabolism: current evidence and therapeutic perspectives. *Cell Metabolism*, 18(1), 29–42. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.05.010>
- Dalle Grave, R., Calugi, S., & Marchesini, G. (2008). Is amenorrhea a clinically useful criterion for the diagnosis of anorexia nervosa? *Behaviour Research and Therapy*, 46(12), 1290–1294. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.brat.2008.08.007>
- Dally, P. J., Oppenheim, G. B., & Sargant, W. (1958). Anorexia Nervosa. *British Medical Journal*, 2, 633–634.
- Dally, P. J., & Sargant, W. (1960). A new treatment of anorexia nervosa. *British Medical Journal*, 1(5188), 1770–1773. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13813846>
- Dally, P., & Sargant, W. (1966). Treatment and outcome of anorexia nervosa. *British Medical Journal*, 2(5517), 793–795. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5918777>
- Davies, C. T. M., Fohlin, L., & Thorén, C. (1979a). Temperature regulation in anorexia nervosa. *Journal of Physiology*, 268, 8P.
- Davies, C. T. M., Fohlin, L., & Thorén, C. (1979b). Temperature Regulation in Anorexia Nervosa Patients during Prolonged Exercise. *Acta Medica Scandinavica*, 205(1-6), 257–262. <https://doi.org/10.1111/j.0954-6820.1979.tb06042.x>
- Davis, C. (1997). Eating Disorders and Hyperactivity: A Psychobiological Perspective. *The Canadian Journal of Psychiatry*, 42(2), 168–175. <https://doi.org/10.1177/070674379704200207>
- Davis, C., Blackmore, E., Katzman, D. K., & Fox, J. (2005). Female adolescents with anorexia nervosa and their parents: a case-control study of exercise attitudes and behaviours. *Psychological Medicine*, 35(3), 377–386.
- Davis, H., & Attia, E. (2017). Pharmacotherapy of eating disorders. *Current Opinion in Psychiatry*, 30(6), 452–457. <https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000358>

- Day, E. A., Ford, R. J., & Steinberg, G. R. (2017). AMPK as a Therapeutic Target for Treating Metabolic Diseases. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 28(8), 545–560. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.05.004>
- De Caprio, C., Alfano, A., Senatore, I., Zarrella, L., Pasanisi, F., & Contaldo, F. (2006). Severe acute liver damage in anorexia nervosa: two case reports. *Nutrition*, 22(5), 572–575. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nut.2006.01.003>
- DeJong, H., Broadbent, H., & Schmidt, U. (2012). A systematic review of dropout from treatment in outpatients with anorexia nervosa. *International Journal of Eating Disorders*, 45(5), 635–647. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/eat.20956>
- De Rijke, C. E., Hillebrand, J. J. G., Verhagen, L. A. W., Roeling, T. A. P., & Adan, R. A. H. (2005). Hypothalamic neuropeptide expression following chronic food restriction in sedentary and wheel-running rats. *Journal of molecular endocrinology*, 35(2), 381–390. <https://doi.org/https://doi.org/10.1677/jme.1.01808>
- Dietrich, M. O., & Horvath, T. L. (2013). Hypothalamic control of energy balance: insights into the role of synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences*, 36(2), 65–73. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.12.005>
- Dixon, D. P., Ackert, A. M., & Eckel, L. A. (2003). Development of, and recovery from, activity-based anorexia in female rats. *Physiology & Behavior*, 80(2), 273–279. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2003.08.008>
- Dodd, G. T., Decherf, S., Loh, K., Simonds, S. E., Wiede, F., Balland, E., ... Tiganis, T. (2015). Leptin and Insulin Act on POMC Neurons to Promote the Browning of White Fat. *Cell*, 160(1), 88–104. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.022>
- Doerries, L. E., Stanley, E. Z., & Aravich, P. F. (1991). Activity-based anorexia: Relationship to gender and activity-stress ulcers. *Physiology & Behavior*, 50(5), 945–949. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9384\(91\)90419-O](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9384(91)90419-O)
- Döring, H., Schwarzer, K., Nuesslein-Hildesheim, B., & Schmidt, I. (1998). Leptin selectively increases energy expenditure of food-restricted lean mice. *International journal of obesity*, 22(2), 83.
- Doucet, E., Imbeault, P., St-Pierre, S., Almeras, N., Mauriege, P., Despres, J.-P., ... Tremblay, A. (2003). Greater than predicted decrease in energy expenditure during exercise after body weight loss in obese men. *Clinical Science (London, England : 1979)*, 105(1), 89–95. <https://doi.org/https://doi.org/10.1042/CS20020252>
- Duan, J., Choi, Y. H., Hartzell, D., Della-Fera, M. A., Hamrick, M., & Baile, C. A. (2007). Effects of subcutaneous leptin injections on hypothalamic gene profiles in lean and ob/ob mice. *Obesity*, 15(11), 2624–2633.
- Dubreucq, S., Durand, A., Matias, I., Bénard, G., Richard, E., Soria-Gomez, E., Glangetas, C., Groc, L., Wadleigh, A., Massa, F., et al. (2013). Ventral tegmental area cannabinoid type-1 receptors control voluntary exercise performance. *Biologi. Psychiatry*, 73, 895–903. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.10.025>
- DuBois, F. S. (1949). Compulsion neurosis with cachexia (anorexia nervosa). *The American Journal of Psychiatry*, 106(2), 107–115. <https://doi.org/https://doi.org/10.1176/ajp.106.2.107>

- Dwyer, R. A. B. & D. M. (1997). Weight Loss in Rats Produced by Running: Effects of Prior Experience and Individual Housing. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology Section B*, 50(2), 129–148. <https://doi.org/10.1080/713932647>
- Eayrs, J. T. (1954). Spontaneous activity in the rat. *British Journal of Animal Behaviour*, 2, 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0950-5601\(54\)80078-5](https://doi.org/10.1016/S0950-5601(54)80078-5)
- Eddy, K. T., Tabri, N., Thomas, J. J., Murray, H. B., Keshaviah, A., Hastings, E., ... Franko, D. L. (2017). Recovery From Anorexia Nervosa and Bulimia Nervosa at 22-Year Follow-Up. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 78(2), 184–189. <https://doi.org/10.4088/JCP.15m10393>
- Egawa, M., Yoshimatsu, H., & Bray, G. A. (1991). Neuropeptide Y suppresses sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue in rats. *The American Journal of Physiology*, 260(2 Pt 2), R328-34. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1991.260.2.R328>
- Ehrlich, S., Burghardt, R., Schneider, N., Broecker-Preuss, M., Weiss, D., Merle, J. V., ... Hebebrand, J. (2009). The role of leptin and cortisol in hyperactivity in patients with acute and weight-recovered anorexia nervosa. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(4), 658–662. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.03.007>
- Eissler, K. R. (1943). Some psychiatric aspects of anorexia nervosa demonstrated by a case report. *Psychoanalytic Review*, 30, 121–145.
- El Ghoch, M., Alberti, M., Milanese, C., Battistini, N. C., Pellegrini, M., Capelli, C., ... Dalle Grave, R. (2012). Comparison between dual-energy X-ray absorptiometry and skinfolds thickness in assessing body fat in anorexia nervosa before and after weight restoration. *Clinical Nutrition*, 31(6), 911–916. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.clnu.2012.03.009>
- Elias, C. F., Aschkenasi, C., Lee, C., Kelly, J., Ahima, R. S., Bjorbaek, C., ... Elmquist, J. K. (1999). Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron*, 23(4), 775–786.
- Elias, C. F., Lee, C., Kelly, J., Aschkenasi, C., Ahima, R. S., Couceyro, P. R., ... Elmquist, J. K. (1998). Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron*, 21(6), 1375–1385.
- Elmquist, J. K., Ahima, R. S., Elias, C. F., Flier, J. S., & Saper, C. B. (1998). Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(2), 741–746.
- Epling, W. F., & Pierce, W. D. (1984). Activity-based anorexia in rats as a function of opportunity to run on an activity wheel. *Nutrition & Behavior*, 2(1), 37–49.
- Epling, W. F., & Pierce, W. D. (1988). Activity-based anorexia: A biobehavioral perspective. *International Journal of Eating Disorders*, 7(4), 475–485. [https://doi.org/10.1002/1098-108X\(198807\)7:4<475::AID-EAT2260070405>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1098-108X(198807)7:4<475::AID-EAT2260070405>3.0.CO;2-M)
- Epling, W. F., & Pierce, W. D. (1991). Solving the anorexia puzzle. A scientific approach. In *Toronto: Hogrefe and Huber publishers*.

- Epling, W. F., & Pierce, W. D. (1996). Activity Anorexia. Theory, Research, and Treatment. In *New Jersey: Mahwah, LEA*.
- Epling, W. F., Pierce, W. D. y Stefan, L. A. (1981). Schedule-induced selfstarvation. In C. M. Bradshaw, E. Szabadi, and C. F. Lowe (Eds.), *Quantification of steady-state operant behaviour* (pp. 393-396). Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press.
- Epling, W. F., Pierce, W. D., & Stefan, L. (1983). A theory of activity-based anorexia. *International Journal of Eating Disorders*, 3(1), 27–46. [https://doi.org/10.1002/1098-108X\(198323\)3:1<27::AID-EAT2260030104>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/1098-108X(198323)3:1<27::AID-EAT2260030104>3.0.CO;2-T)
- Escamilla, R. F., & Lissner, H. (1942). Simmonds' Disease. A Clinical Study with Review of the Literature; Differentiation from Anorexia Nervosa by Statistical Analysis of 595 Cases, 101 of Which Were Proved Pathologically1. *The Journal of Clinical Endocrinology*, 2(2), 65–96. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1210/jcem-2-2-65>
- Esch, T., & Stefano, G. B. (2004). The neurobiology of pleasure, reward processes, addiction and their health implications. *Neuro Endocrinology Letters*, 25(4), 235–251.
- Esteve Ràfols, M. (2014). Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional. *Endocrinología y Nutrición*, 61(2), 100–112. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.endonu.2013.03.011>
- Evans, J. C. G. (1939). Anorexia nervosa, 1, 268–269.
- Evans, M.C., & Anderson, G.M. (2017). Dopamine neuron-restricted leptin receptor signaling reduces some aspects of food reward but exacerbates the obesity of leptin receptordeficient male mice. *Endocrinology*, 158, 4246–4256. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00513>
- Evans MC, Kumar NS, Inglis MA, Anderson GM. (2018). Leptin and insulin do not exert redundant control of metabolic or emotive function via dopamine neurons. *Hormones and Behavior*, 106:93–104. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.10.001>
- Everitt, B. J., & Hokfelt, T. (1990). Neuroendocrine anatomy of the hypothalamus. *Acta Neurochirurgica. Supplementum*, 47, 1–15.
- Exner, C., Hebebrand, J., Remschmidt, H., Wewetzer, C., Ziegler, A., Herpertz, S., ... Klingenspor, M. (2000). Leptin suppresses semi-starvation induced hyperactivity in rats: implications for anorexia nervosa. *Molecular Psychiatry*, 5, 476. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000771>
- Fairburn, C. G. (2005). Evidence-based treatment of anorexia nervosa. *International Journal of Eating Disorders*, 37(S1), S26–S30. <https://doi.org/10.1002/eat.20112>
- Farquharson, R. F. (1941). Anorexia nervosa. *Illinois Medical Journal*, 80, 193–197.
- Farquharson, R., & Hyland, H. (1938). Anorexia nervosa: A metabolic disorder of psychologic origin. *Journal of the American Medical Association*, 111(12), 1085–1092. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1001/jama.1938.02790380027007>
- Farr, O. M., Gavrieli, A., & Mantzoros, C. S. (2015). Leptin applications in 2015: what have we learned about leptin and obesity? *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*, 22(5), 353–359. <https://doi.org/10.1097/MED.000000000000184>

- Favaro, A., Caregaro, L., Tenconi, E., Bosello, R., & Santonastaso, P. (2009). Time trends in age at onset of anorexia nervosa and bulimia nervosa. *The Journal of Clinical Psychiatry*, *70*(12), 1715–1721. <https://doi.org/10.4088/jcp.09m05176blu>
- Favaro, A., Ferrara, S., & Santonastaso, P. (2003). The Spectrum of Eating Disorders in Young Women: A Prevalence Study in a General Population Sample. *Psychosomatic Medicine*, *65*(4). Retrieved from https://journals.lww.com/psychosomaticmedicine/Fulltext/2003/07000/The_Spectrum_of_Eating_Disorders_in_Young_Women__A.33.aspx
- Favaro, A., & Santonastaso, P. (2009). Seasonality and the prediction of weight at resumption of menses in anorexia nervosa. *Fertility and Sterility*, *91*(4, Supplement), 1395–1397. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.04.055>
- Fearon, K. C. H., Glass, D. J., & Guttridge, D. C. (2012). Cancer Cachexia: Mediators, Signaling, and Metabolic Pathways. *Cell Metabolism*, *16*(2), 153–166. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.06.011>
- Fearon, K., Strasser, F., Anker, S. D., Bosaeus, I., Bruera, E., Fainsinger, R. L., ... Baracos, V. E. (2011). Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *The Lancet Oncology*, *12*(5), 489–495. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70218-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70218-7)
- Fei-Wang, Tian, D.-R., Tso, P., & Han, J.-S. (2012). Diet-induced obese rats exhibit impaired LKB1-AMPK signaling in hypothalamus and adipose tissue. *Peptides*, *35*(1), 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.02.003>
- Feillet, F., Feillet-Coudray, C., Bard, J.-M., Parra, H.-J., Favre, E., Kabuth, B., ... Vidailhet, M. (2000). Plasma cholesterol and endogenous cholesterol synthesis during refeeding in anorexia nervosa. *Clinica Chimica Acta*, *294*(1), 45–56. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(99\)00256-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0009-8981(99)00256-9)
- Fekete, C., Kelly, J., Mihaly, E., Sarkar, S., Rand, W. M., Legradi, G., ... Lechan, R. M. (2001). Neuropeptide Y has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology*, *142*(6), 2606–2613. <https://doi.org/10.1210/endo.142.6.8207>
- Fekete, C., Sarkar, S., Rand, W. M., Harney, J. W., Emerson, C. H., Bianco, A. C., ... Lechan, R. M. (2002). Neuropeptide Y1 and Y5 receptors mediate the effects of neuropeptide Y on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology*, *143*(12), 4513–4519. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220574>
- Fernandes, M.F., Matthys, D., Hryhorczuk, C., Sharma, S., Mogra, S., Alquier, T., et al. (2015). Leptin suppresses the rewarding effects of running via STAT3 signaling in dopamine neurons. *Cell Metabolism*, *6*, 741–749. doi: 10.1016/j.cmet.2015.08.003
- Fernandez-Galaz, C., Fernandez-Agullo, T., Perez, C., Peralta, S., Arribas, C., Andres, A., ... & Ros, M. (2002). Long-term food restriction prevents ageing-associated central leptin resistance in wistar rats. *Diabetologia*, *45*(7), 997-1003. <https://doi.org/10.1007/s00125-002-0851-4>
- Ferno, J., Senaris, R., Dieguez, C., Tena-Sempere, M., & Lopez, M. (2015). Orexins (hypocretins) and energy balance: More than feeding. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *418 Pt 1*, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.07.022>

- Fessler, D. M. T. (2002). Pseudoparadoxical impulsivity in restrictive anorexia nervosa: A consequence of the logic of scarcity. *International Journal of Eating Disorders*, 31(4), 376–388. <https://doi.org/10.1002/eat.10035>
- Fetissov, S. O., Hamze Sinno, M., Coquerel, Q., Do Rego, J. C., Coeffier, M., Gilbert, D., ... Dechelotte, P. (2008). Emerging role of autoantibodies against appetite-regulating neuropeptides in eating disorders. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 24(9), 854–859. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2008.06.021>
- Fichter, M. M., Quadflieg, N., Nisslmüller, K., Lindner, S., Osen, B., Huber, T., & Wünsch-Leiteritz, W. (2012). Does internet-based prevention reduce the risk of relapse for anorexia nervosa? *Behaviour Research and Therapy*, 50(3), 180–190. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.brat.2011.12.003>
- Finger, F. W. (1951). The effect of food deprivation and subsequent satiation upon general activity in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. US: American Psychological Association. <https://doi.org/10.1037/h0055692>
- Fischer, A. W., Hoefig, C. S., Abreu-Vieira, G., de Jong, J. M. A., Petrovic, N., Mittag, J., ... Nedergaard, J. (2016). Leptin Raises Defended Body Temperature without Activating Thermogenesis. *Cell Reports*, 14(7), 1621–1631. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.041>
- Flament, M. F., Bissada, H., & Spettigue, W. (2012). Evidence-based pharmacotherapy of eating disorders. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 15(2), 189–207. <https://doi.org/10.1017/S1461145711000381>
- Föcker, M., Timmesfeld, N., Scherag, S., Bühren, K., Langkamp, M., Dempfle, A., ... Hebebrand, J. (2011). Screening for anorexia nervosa via measurement of serum leptin levels. *Journal of Neural Transmission*, 118(4), 571–578. <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0551-z>
- Foldi, C. J., Milton, L. K., & Oldfield, B. J. (2017a). The Role of Mesolimbic Reward Neurocircuitry in Prevention and Rescue of the Activity-Based Anorexia (ABA) Phenotype in Rats. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 42(12), 2292–2300. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.63>
- Foldi, C. J., Milton, L. K., & Oldfield, B. J. (2017b). A focus on reward in anorexia nervosa through the lens of the activity-based anorexia rodent model. *Journal of Neuroendocrinology*, 29(10), e12479. <https://doi.org/10.1111/jne.12479>
- Fraga, A., Caggianesse, V., Carrera, O., Graell, M., Morandé, G., & Gutiérrez, E. (2015). Seasonal BMI differences between restrictive and purging anorexia nervosa subtypes. *International Journal of Eating Disorders*, 48(1), 35–41. <https://doi.org/10.1002/eat.22357>
- Frank, G. K. W., Reynolds, J. R., Shott, M. E., Jappe, L., Yang, T. T., Tregellas, J. R., & O'Reilly, R. C. (2012). Anorexia nervosa and obesity are associated with opposite brain reward response. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 37(9), 2031–2046. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.51>

- Frank, G. K. W., & Shott, M. E. (2016). The Role of Psychotropic Medications in the Management of Anorexia Nervosa: Rationale, Evidence and Future Prospects. *CNS Drugs*, 30(5), 419–442. <https://doi.org/10.1007/s40263-016-0335-6>
- Friedman, J. M., & Halaas, J. L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395, 763. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/27376>
- Frintrop, L., Trinh, S., Liesbrock, J., Paulukat, L., Kas, M. J., Tolba, R., ... Seitz, J. (2018). Establishment of a chronic activity-based anorexia rat model. *Journal of Neuroscience Methods*, 293, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.09.018>
- Fuller-Jackson, J. P., Clarke, I. J., Rao, A., & Henry, B. A. (2018). Exercise counteracts the homeostatic decrease in thermogenesis caused by caloric restriction in sheep. *The FASEB Journal*, 32(7), 3859-3869.
- Fulton, S., Pissios, P., Manchon, R.P., Stiles, L., Frank, L., Pothos, E.N., Maratos-Flier, E., and Flier, J.S. (2006). Leptin regulation of the mesoaccumbens dopamine pathway. *Neuron*, 51, 811–822. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.006>
- Gao, X.-B., & Horvath, T. (2014). Function and dysfunction of hypocretin/orexin: an energetics point of view. *Annual Review of Neuroscience*, 37, 101–116. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071013-013855>
- Garfinkel, P. E., & Garner, D. M. (1982). Anorexia nervosa: A multidimensional approach. In *New York: Brunner/Mazel*.
- Garfinkel, P. E., Lin, E., Goering, P., Spegg, C., Goldbloom, D., Kennedy, S., ... Woodside, D. B. (1996). Should amenorrhoea be necessary for the diagnosis of anorexia nervosa? Evidence from a Canadian community sample. *The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science*, 168(4), 500–506.
- Garg, A. (2004). Acquired and inherited lipodystrophies, 350, 1220–1234.
- Garner, D. M. (1991). Eating Disorders Inventory-2: Professional manual. In *Odessa, FL: Psychological Assessment Resources*.
- Garner, D. M., & Garfinkel, P. E. (1979). The Eating Attitudes Test: An index of the symptoms of anorexia nervosa. *Psychological Medicine*, 9, 273–279.
- Geerling, J. C., Shin, J.-W., Chimenti, P. C., & Loewy, A. D. (2010). Paraventricular hypothalamic nucleus: axonal projections to the brainstem. *The Journal of Comparative Neurology*, 518(9), 1460–1499. <https://doi.org/10.1002/cne.22283>
- Gehlert, D. R., Chronwall, B. M., Schafer, M. P., & O'Donohue, T. L. (1987). Localization of neuropeptide Y messenger ribonucleic acid in rat and mouse brain by in situ hybridization. *Synapse (New York, N.Y.)*, 1(1), 25–31. <https://doi.org/10.1002/syn.890010106>
- Gendall, K. A., Joyce, P. R., Carter, F. A., McIntosh, V. V, Jordan, J., & Bulik, C. M. (2006). The psychobiology and diagnostic significance of amenorrhea in patients with anorexia nervosa. *Fertility and Sterility*, 85(5), 1531–1535. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.10.048>
- Golden, N. H., Jacobson, M. S., Schebendach, J., Solanto, M. V, Hertz, S. M., & Shenker, I. R. (1997). Resumption of menses in anorexia nervosa. *Archives of Pediatrics & Adolescent*

- Medicine*, 151(1), 16–21.
- Gonzalez-Garcia, I., Contreras, C., Estevez-Salguero, A., Ruiz-Pino, F., Colsh, B., Pensado, I., ... Lopez, M. (2018). Estradiol Regulates Energy Balance by Ameliorating Hypothalamic Ceramide-Induced ER Stress. *Cell Reports*, 25(2), 413–423.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.038>
- Gordon, C. J., Lee, K. L., Chen, T. L., Killough, P., & Ali, J. S. (1991). Dynamics of behavioral thermoregulation in the rat. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 261(3), R705–R711. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1991.261.3.R705>
- Gotoh, K., Fukagawa, K., Fukagawa, T., Noguchi, H., Kakuma, T., Sakata, T., & Yoshimatsu, H. (2007). Hypothalamic neuronal histamine mediates the thyrotropin-releasing hormone-induced suppression of food intake. *Journal of Neurochemistry*, 103(3), 1102–1110. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04802.x>
- Gowers, S. G., Clark, A., Roberts, C., Griffiths, A., Edwards, V., Bryan, C., ... Barrett, B. (2007). Clinical effectiveness of treatments for anorexia nervosa in adolescents: randomised controlled trial. *The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science*, 191, 427–435. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.107.036764>
- Gowers, S. G., Weetman, J., Shore, A., Hossain, F., & Elvins, R. (2000). Impact of hospitalisation on the outcome of adolescent anorexia nervosa. *The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science*, 176, 138–141.
- Graham, M., Shutter, J. R., Sarmiento, U., Sarosi, I., & Stark, K. L. (1997, November). Overexpression of Agtr leads to obesity in transgenic mice. *Nature Genetics*. United States. <https://doi.org/10.1038/ng1197-273>
- Greenwood, B.N., Foley, T.E., Le, T.V., Strong, P.V., Loughridge, A.B., Day, H.E., and Fleshner, M. (2011). Long-term voluntary wheel running is rewarding and produces plasticity in the mesolimbic reward pathway. *Behavioural Brain Research*, 217, 354–362. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.005>
- Gredilla, R., & Barja, G. (2005). Minireview: The Role of Oxidative Stress in Relation to Caloric Restriction and Longevity. *Endocrinology*, 146(9), 3713–3717. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0378>
- Grinspoon, S., Gulick, T., Askari, H., Landt, M., Lee, K., Anderson, E., ... Klibanski, A. (1996). Serum leptin levels in women with anorexia nervosa. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81(11), 3861–3863. <https://doi.org/10.1210/jcem.81.11.8923829>
- Grinspoon, S., Thomas, E., Pitts, S., Gross, E., Mickley, D., Miller, K., ... Klibanski, A. (2000). Prevalence and predictive factors for regional osteopenia in women with anorexia nervosa. *Annals of Internal Medicine*, 133(10), 790–794.
- Guan, X. M., Yu, H., Trumbauer, M., Frazier, E., Van der Ploeg, L. H., & Chen, H. (1998). Induction of neuropeptide Y expression in dorsomedial hypothalamus of diet-induced obese mice. *Neuroreport*, 9(15), 3415–3419.
- Gull, W. (1868). The address in medicine delivered before the Annual Meeting of the British

- Medical Association at Oxford. *Lancet (London, England)*, 2, 171–176.
- Gull, W. (1873). Anorexia hystérica (apepsia hystérica). *British Medical Journal*, 2, 527–528.
- Gull, W. (1874). Anorexia nervosa (apepsia hysterica, anorexia hysterica). *Transactions of the Clinical Society of London*, 7, 22–28.
- Gutierrez, E. (2013). A rat in the labyrinth of anorexia nervosa: Contributions of the activity-based anorexia rodent model to the understanding of anorexia nervosa. *International Journal of Eating Disorders*, 46(4), 289–301. <https://doi.org/10.1002/eat.22095>
- Gutiérrez, E. (2011). Anorexia nervosa: La rata o el diván. *Acción Psicológica*, 8(1), 57–70.
- Gutiérrez, E., Baysari, M. T., Carrera, O., Whitford, T. J., & Boakes, R. A. (2006). High ambient temperature reduces rate of body-weight loss produced by wheel running. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 59(7), 1196–1211. <https://doi.org/10.1080/17470210500417688>
- Gutiérrez, E., & Carrera, O. (2014). Psychotherapy in anorexia nervosa: What does the absence of evidence mean? *World Journal of Translational Medicine*, 3(3), 150–157. <https://doi.org/10.5528/wjtm.v3.i3.150>
- Gutiérrez, E., & Carrera, O. (2016). Anorexia nervosa and body-image disturbance. *The Lancet Psychiatry*, 3(2), e9–e10. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(15\)00581-7](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(15)00581-7)
- Gutiérrez, E., & Carrera, O. (2018). Anorexia nervosa treatments and Occam's razor. *Psychological Medicine*, 48(8), 1390–1391. <https://doi.org/DOI:10.1017/S0033291717003944>
- Gutierrez, E., Carrera, O., Vazquez, R., & Birmingham, C. L. (2013). Climate might be considered as a risk factor for anorexia nervosa? A hypothesis worth another look. *Eating Behaviors*, 14(3), 278–280. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eatbeh.2013.05.006>
- Gutierrez, E., Carrera, O., Vazquez, R., Puime, A., Fraga, A., & Claver, E. (2017). The Association of Anorexia Nervosa and Climate Revisited: A Bibliometric Perspective. *International Journal of Emergency Mental Health and Human Resilience*, 19(3), 1–7.
- Gutierrez, E., Cerrato, M., Carrera, O., & Vazquez, R. (2008). Heat reversal of activity-based anorexia: Implications for the treatment of anorexia nervosa. *International Journal of Eating Disorders*, 41(7), 594–601. <https://doi.org/10.1002/eat.20535>
- Gutiérrez, E., Churrua, I., Zárata, J., Carrera, O., Portillo, M. P., Cerrato, M., ... Echevarría, E. (2009). High ambient temperature reverses hypothalamic MC4 receptor overexpression in an animal model of anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology*, 34(3), 420–429. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.psychneuen.2008.10.003>
- Gutierrez, E. & Vazquez, R. Los Supuestos en la Anorexia Nerviosa. Lo Marginal y lo Esencial. En L.J. Fernández y G. Jusué (coord.) *Trastornos de la Alimentación: De la Evaluación al Tratamiento*. (pp. 219-230). Madrid: UNED: 2004
- Gutiérrez, E., & Vázquez, R. (2001). Heat in the treatment of anorexia nervosa patients. *Eating and Weight Disorders*, 6, 49–52.
- Gutierrez, E., Vazquez, R., & Boakes, R. A. (2002). Activity-based anorexia: ambient

- temperature has been a neglected factor. *Psychonomic Bulletin & Review*, 9(2), 239–249.
- Gutiérrez, M. T., & Pellón, R. (2002). Anorexia por actividad: una revisión teórica y experimental. *Journal of Psychology and Psychological Therapy*, 2(2), 131–145.
- Haas, V. K., Gaskin, K. J., Kohn, M. R., Clarke, S. D., & Müller, M. J. (2010). Different thermic effects of leptin in adolescent females with varying body fat content. *Clinical Nutrition*, 29(5), 639–645. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2010.03.013>
- Habermas, T. (1996). In defense of weight phobia as the central organizing motive in anorexia nervosa: Historical and cultural arguments for a culture-sensitive psychological conception. *International Journal of Eating Disorders*, 19(4), 317–334. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-108X\(199605\)19:4<317::AID-EAT1>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-108X(199605)19:4<317::AID-EAT1>3.0.CO;2-O)
- Halaas, J. L., Boozer, C., Blair-West, J., Fidahusein, N., Denton, D. A., & Friedman, J. M. (1997). Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(16), 8878–8883. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.16.8878>
- Hall, J. F., & Hanford, P. V. (1954). Activity as a function of a restricted feeding schedule. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. US: American Psychological Association. <https://doi.org/10.1037/h0060276>
- Hall, R. C., & Beresford, T. P. (1989). Medical complications of anorexia and bulimia. *Psychiatric Medicine*, 7(4), 165–192. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/2690189>
- Halmi, K. A. (2009). Perplexities and provocations of eating disorders. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 50(1-2), 163–169. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.2008.01983.x>
- Halmi, K. A., Agras, W. S., Crow, S., Mitchell, J., Wilson, G. T., Bryson, S. W., & Kraemer, H. C. (2005). Predictors of Treatment Acceptance and Completion in Anorexia Nervosa: Implications for Future Study Designs. *Archives of General Psychiatry*, 62(7), 776–781. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.62.7.776>
- Halmi, K. A., Powers, P., & Cunningham, S. (1975). Treatment of anorexia nervosa with behavior modification. Effectiveness of formula feeding and isolation. *Archives of General Psychiatry*, 32(1), 93–96.
- Halmi, K., & Fry, M. (1974). Serum lipids in anorexia nervosa. *Biological Psychiatry*, 8(2), 159–167. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/4842376>
- Haltiner, A. L., Mitchell, T. D., & Harris, R. B. (2004). Leptin action is modified by an interaction between dietary fat content and ambient temperature. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287(5), R1250–R1255. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00313.2004>
- Hara, C., & Ogawa, N. (1984). Effects of psychotropic drugs on the development of activity-stress ulcer in rats. *Japanese Journal of Pharmacology*, 35(4), 474–477.
- Hara, C., Ogawa, N., & Imada, Y. (1981). The activity-stress ulcer and antibody production in rats. *Physiology & Behavior*, 27(4), 609–613. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(81\)90230-4](https://doi.org/10.1016/0031-9384(81)90230-4)

- Hardie, D. G. (2007). AMP-activated protein kinase as a drug target. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47, 185–210. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105304>
- Hardie, D. G. (2014). AMPK—Sensing Energy while Talking to Other Signaling Pathways. *Cell Metabolism*, 20(6), 939–952. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.09.013>
- Hardie, D. G., Ross, F. A., & Hawley, S. A. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(4), 251–262. <https://doi.org/10.1038/nrm3311>
- Hardie, D. G., Schaffer, B. E., & Brunet, A. (2016). AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs. *Trends in Cell Biology*, 26(3), 190–201. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.10.013>
- Harris, R. B., Mitchell, T. D., Kelso, E. W., & Flatt, W. P. (2007). Changes in environmental temperature influence leptin responsiveness in low-and high-fat-fed mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 293(1), R106-R115. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00848.2006>
- Harris, R. B., Zhou, J., Redmann Jr, S. M., Smagin, G. N., Smith, S. R., Rodgers, E., & Zachwieja, J. J. (1998). A leptin dose-response study in obese (ob/ob) and lean (+/?) mice. *Endocrinology*, 139(1), 8-19. <https://doi.org/10.1210/endo.139.1.5675>
- Hawley, S. A., Pan, D. A., Mustard, K. J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A. M., ... Hardie, D. G. (2005). Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metabolism*, 2(1), 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.05.009>
- He, M., Zhang, Q., Deng, C., Wang, H., & Huang, X.-F. (2014). Olanzapine-activated AMPK signaling in the dorsal vagal complex is attenuated by histamine H1 receptor agonist in female rats. *Endocrinology*, 155(12), 4895–4904. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1326>
- Hebebrand, J., & Albayrak, Ö. (2012). Leptin treatment of patients with anorexia nervosa? The urgent need for initiation of clinical studies. *European Child & Adolescent Psychiatry*, 21(2), 63–66. <https://doi.org/10.1007/s00787-012-0243-3>
- Hebebrand, J., & Bulik, C. M. (2011). Critical appraisal of the provisional DSM-5 criteria for anorexia nervosa and an alternative proposal. *International Journal of Eating Disorders*, 44(8), 665–678. <https://doi.org/10.1002/eat.20875>
- Hebebrand, J., Casper, R., Treasure, J., & Schweiger, U. (2004). The need to revise the diagnostic criteria for anorexia nervosa. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 111(7), 827–840. <https://doi.org/10.1007/s00702-004-0136-9>
- Hebebrand, J., Exner, C., Hebebrand, K., Holtkamp, C., Casper, R. C., Remschmidt, H., ... Klingenspor, M. (2003). Hyperactivity in patients with anorexia nervosa and in semistarved rats: evidence for a pivotal role of hypoleptinemia. *Physiology & Behavior*, 79(1), 25–37. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(03\)00102-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9384(03)00102-1)
- Helmrich, S. P., Ragland, D. R., Leung, R. W., & Paffenbarger, R. S. (1991). Physical Activity and Reduced Occurrence of Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *New England*

- Journal of Medicine*, 325(3), 147–152. <https://doi.org/10.1056/NEJM199107183250302>
- Herpertz-Dahlmann, B., Konrad, K., Timmesfeld, N., & Dempfle, A. (2014, July). Treatment of adolescents with anorexia nervosa--authors' reply. *Lancet (London, England)*. England. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61205-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61205-8)
- Herpertz-Dahlmann, B., van Elburg, A., Castro-Fornieles, J., & Schmidt, U. (2015). ESCAP Expert Paper: New developments in the diagnosis and treatment of adolescent anorexia nervosa--a European perspective. *European Child & Adolescent Psychiatry*, 24(10), 1153–1167. <https://doi.org/10.1007/s00787-015-0748-7>
- Hetherington, A. W., & Ranson, S. W. (1940). Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *The Anatomical Record*, 78(2), 149–172. <https://doi.org/10.1002/ar.1090780203>
- Hetherington, A. W., & Ranson, S. W. (1942). The relation of various hypothalamic lesions to adiposity in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 76(3), 475–499. <https://doi.org/10.1002/cne.900760308>
- Hillebrand, J. J. G., de Rijke, C. E., Brakkee, J. H., Kas, M. J. H., & Adan, R. A. H. (2005a). Voluntary access to a warm plate reduces hyperactivity in activity-based anorexia. *Physiology & Behavior*, 85(2), 151–157. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.03.017>
- Hillebrand, J. J. G., Koeners, M. P., de Rijke, C. E., Kas, M. J. H., & Adan, R. A. H. (2005b). Leptin Treatment in Activity-Based Anorexia. *Biological Psychiatry*, 58(2), 165–171. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.03.011>
- Hillebrand, J. J. G., van Elburg, A. A., Kas, M. J. H., van Engeland, H., & Adan, R. A. H. (2005c). Olanzapine reduces physical activity in rats exposed to activity-based anorexia: possible implications for treatment of anorexia nervosa? *Biological Psychiatry*, 58(8), 651–657. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.04.008>
- Hillebrand, J. J. G., Kas, M. J. H., Scheurink, A. J. W., van Dijk, G., & Adan, R. A. H. (2006). AgRP(83-132) and SHU9119 differently affect activity-based anorexia. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 16(6), 403–412. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2005.11.004>
- Himmerich, H., Joaquim, M., Bentley, J., Kan, C., Dornik, J., Treasure, J., & Schmidt, U. (2018). Psychopharmacological options for adult patients with anorexia nervosa: the patients' and carers' perspectives. *CNS Spectrums*, 23(4), 251–252. <https://doi.org/DOI:10.1017/S1092852917000529>
- Hoek, H. W., & van Hoeken, D. (2003). Review of the prevalence and incidence of eating disorders. *International Journal of Eating Disorders*, 34(4), 383–396. <https://doi.org/10.1002/eat.10222>
- Holm, C., Fredrikson, G., Cannon, B., & Belknap, P. (1987). Hormone-sensitive lipase in brown adipose tissue: Identification and effect of cold exposure. *Bioscience Reports*, 7(11), 897 LP-904. <https://doi.org/10.1007/BF01119481>
- Holtkamp, K., Hebebrand, J., & Herpertz-Dahlmann, B. (2004). The contribution of anxiety and food restriction on physical activity levels in acute anorexia nervosa. *The International*

Journal of Eating Disorders, 36(2), 163–171. <https://doi.org/10.1002/eat.20035>

- Holtkamp, K., Herpertz-Dahlmann, B., Hebebrand, K., Mika, C., Kratzsch, J., & Hebebrand, J. (2006). Physical Activity and Restlessness Correlate with Leptin Levels in Patients with Adolescent Anorexia Nervosa. *Biological Psychiatry*, 60(3), 311–313. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.11.001>
- Hommel, J. D., Trinko, R., Sears, R. M., Georgescu, D., Liu, Z.-W., Gao, X.-B., ... DiLeone, R. J. (2006). Leptin Receptor Signaling in Midbrain Dopamine Neurons Regulates Feeding. *Neuron*, 51(6), 801–810. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.023>
- Hotta, M., Shibasaki, T., Masuda, A., Imaki, T., Demura, H., Ling, N., & Shizume, K. A. Z. U. O. (1986). The responses of plasma adrenocorticotropin and cortisol to corticotropin-releasing hormone (CRH) and cerebrospinal fluid immunoreactive CRH in anorexia nervosa patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 62(2), 319–324. <https://doi.org/10.1210/jcem-62-2-319>
- Hou, J., Zheng, D.-Z., Zhou, J.-Y., & Zhou, S.-W. (2010). Orexigenic effect of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) after injection into hypothalamic nuclei in streptozotocin-diabetic rats. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 37(10), 989–995. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2010.05423.x>
- Hsu, L. K., & Lee, S. (1993). Is weight phobia always necessary for a diagnosis of anorexia nervosa? *The American Journal of Psychiatry*, 150(10), 1466–1471. <https://doi.org/10.1176/ajp.150.10.1466>
- Hu, C., Bi, C., Hsu, C.-K., Hsiung, H. M., Sliker, L. J., Asnicar, M., ... Zhang, Q. (2002). Targeted Disruption of the Melanin-Concentrating Hormone Receptor-1 Results in Hyperphagia and Resistance to Diet-Induced Obesity. *Endocrinology*, 143(7), 2469–2477. <https://doi.org/10.1210/endo.143.7.8903>
- Hudson, J. I., Hiripi, E., Pope, H. G., & Kessler, R. C. (2007). The Prevalence and Correlates of Eating Disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Biological Psychiatry*, 61(3), 348–358. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.03.040>
- Hulbert, A. J., & Else, P. L. (2004). Basal metabolic rate: history, composition, regulation, and usefulness. *Physiological and Biochemical Zoology: PBZ*, 77(6), 869–876. <https://doi.org/10.1086/422768>
- Hulsey, M. G., Lu, H., Wang, T., Martin, R. J., & Baile, C. A. (1998). Intracerebroventricular (icv) administration of mouse leptin in rats: behavioral specificity and effects on meal patterns. *Physiology & behavior*, 65(3), 445–455. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00180-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00180-2)
- Hurley, R. L., Anderson, K. A., Franzone, J. M., Kemp, B. E., Means, A. R., & Witters, L. A. (2005). The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(32), 29060–29066. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503824200>
- Hurst, A. (1939). Discussion on anorexia nervosa. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 32, 742.

- Ibuka, N., Inouye, S. T., & Kawamura, H. (1977). Analysis of sleep-wakefulness rhythms in male rats after suprachiasmatic nucleus lesions and ocular enucleation. *Brain Research*, *122*(1), 33–47. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-8993\(77\)90660-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-8993(77)90660-6)
- Idrobo, F., Nandy, K., Mostofsky, D. I., Blatt, L., & Nandy, L. (1987). Dietary restriction: effects on radial maze learning and lipofuscin pigment deposition in the hippocampus and frontal cortex. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, *6*(4), 355–362. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0167-4943\(87\)90014-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0167-4943(87)90014-8)
- Iio, W., Tokutake, Y., Koike, H., Matsukawa, N., Tsukahara, T., Chohnan, S., & Toyoda, A. (2015). Effects of chronic mild food restriction on behavior and the hypothalamic malonyl-CoA signaling pathway. *Animal Science Journal = Nihon Chikusan Gakkaiho*, *86*(2), 181–188. <https://doi.org/10.1111/asj.12255>
- Iio, W., Tokutake, Y., Matsukawa, N., Tsukahara, T., Chohnan, S., & Toyoda, A. (2012). Anorexic behavior and elevation of hypothalamic malonyl-CoA in socially defeated rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *421*(2), 301–304. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.04.004>
- Imbernon, M., Beiroa, D., Vazquez, M. J., Morgan, D. A., Veyrat-Durebex, C., Porteiro, B., ... Nogueiras, R. (2013). Central melanin-concentrating hormone influences liver and adipose metabolism via specific hypothalamic nuclei and efferent autonomic/JNK1 pathways. *Gastroenterology*, *144*(3), 636–649.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.10.051>
- Imbernon, M., Sanchez-Rebordelo, E., Romero-Pico, A., Kallo, I., Chee, M. J., Porteiro, B., ... Nogueiras, R. (2016). Hypothalamic kappa opioid receptor mediates both diet-induced and melanin concentrating hormone-induced liver damage through inflammation and endoplasmic reticulum stress. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *64*(4), 1086–1104. <https://doi.org/10.1002/hep.28716>
- Ivuskans, A., Maestu, J., Jurimae, T., Latt, E., Purge, P., Saar, M., ... Jurimae, J. (2015). Sedentary time has a negative influence on bone mineral parameters in peripubertal boys: a 1-year prospective study. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, *33*(1), 85–92. <https://doi.org/10.1007/s00774-013-0556-4>
- Janet, P. (1903). Les obsessions et la psychasthénie. In *Paris: Felix Alcan.*
- Janet, P. (1907). *The major symptoms of hysteria*. Classics of Psychiatry & Behavioral Sciences Library, Division of Gryphon Editions.
- Jo, Y.-H. (2012). Endogenous BDNF regulates inhibitory synaptic transmission in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Journal of Neurophysiology*, *107*(1), 42–49. <https://doi.org/10.1152/jn.00353.2011>
- John, H. E. (2016). *Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica.*
- Johns, N., Stephens, N. A., & Fearon, K. C. H. (2013). Muscle wasting in cancer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *45*(10), 2215–2229. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.05.032>
- Kahn, B. B., Alquier, T., Carling, D., & Hardie, D. G. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell*

- Metabolism*, 1(1), 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2004.12.003>
- Kaiyala, K. J., Ogimoto, K., Nelson, J. T., Muta, K., & Morton, G. J. (2016). Physiological role for leptin in the control of thermal conductance. *Molecular Metabolism*, 5(10), 892–902. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.07.005>
- Kajimura, S., Spiegelman, B. M., & Seale, P. (2015). Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. *Cell Metabolism*, 22(4), 546–559. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.007>
- Kalra, S. P., Dube, M. G., Sahu, A., Phelps, C. P., & Kalra, P. S. (1991). Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(23), 10931–10935.
- Kalsbeek, A., Bruinstroop, E., Yi, C. X., Klieverik, L. P., La Fleur, S. E., & Fliers, E. (2010). Hypothalamic control of energy metabolism via the autonomic nervous system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1212, 114–129. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05800.x>
- Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Ishii, S., Sugihara, H., & Wakabayashi, I. (2001). Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes*, 50(11), 2438–2443.
- Kanarek, R. B., & Collier, G. H. (1983). Self-starvation: A problem of overriding the satiety signal? *Physiology & Behavior*, 30(2), 307–311. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9384\(83\)90024-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9384(83)90024-0)
- Kanarek, R. B., D'Anci, K. E., Jurdak, N., & Mathes, W. F. (2009). Running and addiction: precipitated withdrawal in a rat model of activity-based anorexia. *Behavioral neuroscience*, 123(4), 905. <http://dx.doi.org/10.1037/a0015896>
- Kas, M. J. H., van Dijk, G., Scheurink, A. J. W., & Adan, R. A. H. (2003). Agouti-related protein prevents self-starvation. *Molecular Psychiatry*, 8, 235. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001206>
- Kaufman, M. R., & Heiman, M. (1964). Evolution of psychosomatic concepts. Anorexia nervosa: A paradigm. In *London: The Hogarth Press*.
- Kaye, W. H., Fudge, J. L., & Paulus, M. (2009). New insights into symptoms and neurocircuit function of anorexia nervosa. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(8), 573–584. <https://doi.org/10.1038/nrn2682>
- Kaye, W. H., Gwirtsman, H. E., George, D. T., Ebert, M. H., Jimerson, D. C., Tomai, T. P., ... & Gold, P. W. (1987). Elevated cerebrospinal fluid levels of immunoreactive corticotropin-releasing hormone in anorexia nervosa: relation to state of nutrition, adrenal function, and intensity of depression. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 64(2), 203–208. <https://doi.org/10.1210/jcem-64-2-203>
- Kaye, W. H., Wierenga, C. E., Bailer, U. F., Simmons, A. N., & Bischoff-Grethe, A. (2013). Nothing tastes as good as skinny feels: the neurobiology of anorexia nervosa. *Trends in Neurosciences*, 36(2), 110–120. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.01.003>
- Keshaviah, A., Edkins, K., Hastings, E. R., Krishna, M., Franko, D. L., Herzog, D. B., ... Eddy,

- K. T. (2014). Re-examining premature mortality in anorexia nervosa: A meta-analysis redux. *Comprehensive Psychiatry*, 55(8), 1773–1784. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.comppsy.2014.07.017>
- Keys, A., Brozek, J., Henschel, A., Mickelsen, O., & Taylor, H. L. (1950). The biology of human starvation (2 vols.). *Minneapolis: University of Minnesota Press*.
- Kidd, C. B., & Wood, J. F. (1966). Some Observations on Anorexia Nervosa. *Postgraduate Medical Journal*, 42(489), 443–448. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2465864/>
- Kim, E.-K., Miller, I., Aja, S., Landree, L. E., Pinn, M., McFadden, J., ... Ronnett, G. V. (2004). C75, a fatty acid synthase inhibitor, reduces food intake via hypothalamic AMP-activated protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(19), 19970–19976. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402165200>
- Kim, K. W., Zhao, L., Donato, J. J., Kohno, D., Xu, Y., Elias, C. F., ... Elmquist, J. K. (2011). Steroidogenic factor 1 directs programs regulating diet-induced thermogenesis and leptin action in the ventral medial hypothalamic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(26), 10673–10678. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102364108>
- Kim, M. S., Rossi, M., Abusnana, S., Sunter, D., Morgan, D. G., Small, C. J., ... Bloom, S. R. (2000). Hypothalamic localization of the feeding effect of agouti-related peptide and alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Diabetes*, 49(2), 177–182.
- Kim, S. F. (2012). Animal models of eating disorders. *Neuroscience*, 211, 2–12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.03.024>
- King, A. (1963). Primary and secondary anorexia nervosa syndromes. *The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science*, 109, 470–479.
- Klein, D. A., & Walsh, B. T. (2005). Translational approaches to understanding anorexia nervosa. *International Journal of Eating Disorders*, 37(S1), S10–S14. <https://doi.org/10.1002/eat.20108>
- Klenotich, S. J., & Dulawa, S. C. (2012). The Activity-Based Anorexia Mouse Model BT - Psychiatric Disorders: Methods and Protocols. In F. H. Kobeissy (Ed.) (pp. 377–393). Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-458-2_25
- Klinefelter, H. F. (1965). Hypercholesterolemia in anorexia nervosa. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 25, 1520–1521. <https://doi.org/10.1210/jcem-25-11-1520>
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., & Kangawa, K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402(6762), 656–660. <https://doi.org/10.1038/45230>
- Korek, E., Krauss, H., Gibas-Dorna, M., Kupsz, J., Piątek, M., & Piątek, J. (2013). Fasting and postprandial levels of ghrelin, leptin and insulin in lean, obese and anorexic subjects. *Przegląd Gastroenterologiczny*, 8(6), 383–389. <https://doi.org/10.5114/pg.2013.39922>
- Korner, J., Savontaus, E., Chua Jr, S. C., Leibel, R. L., & Wardlaw, S. L. (2001). Leptin Regulation of Agrp and Npy mRNA in the Rat Hypothalamus. *Journal of Neuroendocrinology*, 13(11), 959–966. <https://doi.org/10.1046/j.1365->

2826.2001.00716.x

- Kostrzewa, E., van Elburg, A. A., Sanders, N., Sternheim, L., Adan, R. A. H., & Kas, M. J. H. (2013). Longitudinal Changes in the Physical Activity of Adolescents with Anorexia Nervosa and Their Influence on Body Composition and Leptin Serum Levels after Recovery. *PLOS ONE*, 8(10), e78251. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078251>
- Kotz, C. M., Wang, C. F., Briggs, J. E., Levine, A. S., & Billington, C. J. (2000). Effect of NPY in the hypothalamic paraventricular nucleus on uncoupling proteins 1, 2, and 3 in the rat. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 278(2), R494-8. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.278.2.R494>
- Kovacs, M. (1992). Children's Depression Inventory (CDI) Manual. In *Multi-Health Systems, Ontario*.
- Krahn, D. D., Gosnell, B. A., Levine, A. S., & Morley, J. E. (1988). Behavioral effects of corticotropin-releasing factor: localization and characterization of central effects. *Brain Research*, 443(1-2), 63-69.
- Krashes, M. J., Koda, S., Ye, C., Rogan, S. C., Adams, A. C., Cusher, D. S., ... Lowell, B. B. (2011). Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(4), 1424-1428. <https://doi.org/10.1172/JCI46229>
- Kristensen, P., Judge, M. E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K. N., Wulff, B. S., ... Hastrup, S. (1998). Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature*, 393(6680), 72-76. <https://doi.org/10.1038/29993>
- Kron, L., Katz, J. L., Gorzynski, G., & Weiner, H. (1978). Hyperactivity in anorexia nervosa: A fundamental clinical feature. *Comprehensive Psychiatry*, 19(5), 433-440. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0010-440X\(78\)90072-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0010-440X(78)90072-X)
- Kyriacou, O., Treasure, J., & Schmidt, U. (2008). Understanding how parents cope with living with someone with anorexia nervosa: Modelling the factors that are associated with carer distress. *International Journal of Eating Disorders*, 41(3), 233-242. <https://doi.org/10.1002/eat.20488>
- Lage, R., Dieguez, C., Vidal-Puig, A., & Lopez, M. (2008). AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends in Molecular Medicine*, 14(12), 539-549. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.09.007>
- Lage, R., Ferno, J., Nogueiras, R., Dieguez, C., & Lopez, M. (2016). Contribution of adaptive thermogenesis to the hypothalamic regulation of energy balance. *The Biochemical Journal*, 473(22), 4063-4082. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160012>
- Lambert, K. G. (1993). The Activity-Stress Paradigm: Possible Mechanisms and Applications. *The Journal of General Psychology*, 120(1), 21-32. <https://doi.org/10.1080/00221309.1993.9917859>
- Lambert, K. G. y Hanrahan, L. (Abril 1990). The Effect of ambient temperature on the activity-stress ulcer paradigm. Sesión de cartel presentada en la reunion de la Southern Society for Philosophy and Psychology, Louisville, KY.
- Lambert, K. G., & Peacock, L. J. (1989). Feeding regime affects activity-stress ulcer

- production. *Physiology & Behavior*, 46(4), 743–746. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9384\(89\)90360-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9384(89)90360-0)
- Lambert, K. G., & Porter, J. H. (1992). Pimozide mitigates excessive running in the activity-stress paradigm. *Physiology & Behavior*, 52(2), 299–304. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9384\(92\)90275-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9384(92)90275-7)
- Landsberg, L., Young, J. B., Leonard, W. R., Linsenmeier, R. A., & Turek, F. W. (2009). Is obesity associated with lower body temperatures? Core temperature: a forgotten variable in energy balance. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 58(6), 871–876. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2009.02.017>
- Lasègue, C. (1873). De l'anorexie hystérique. *Archives Générales de Médecine*, 21, 385–403.
- Lask, B., & Frampton, I. (2009). Anorexia nervosa—irony, misnomer and paradox. *European Eating Disorders Review*, 17(3), 165–168. <https://doi.org/10.1002/erv.933>
- Lattanzio, S. B., & Eikelboom, R. (2003). Wheel access duration in rats: I. Effects on feeding and running. *Behavioral Neuroscience*, 117, 496–504.
- Lau, J., Farzi, A., Qi, Y., Heilbronn, R., Mietzsch, M., Shi, Y.-C., & Herzog, H. (2018). CART neurons in the arcuate nucleus and lateral hypothalamic area exert differential controls on energy homeostasis. *Molecular Metabolism*, 7, 102–118. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.10.015>
- Lau, J., Shi, Y.-C., & Herzog, H. (2016). Temperature dependence of the control of energy homeostasis requires CART signaling. *Neuropeptides*, 59, 97–109. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.npep.2016.03.006>
- Laviano, A., Inui, A., Marks, D. L., Meguid, M. M., Pichard, C., Rossi Fanelli, F., & Seelaender, M. (2008). Neural control of the anorexia-cachexia syndrome. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 295(5), E1000–E1008. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90252.2008>
- Le Thuc, O., Stobbe, K., Cansell, C., Nahon, J.-L., Blondeau, N., & Rovere, C. (2017). Hypothalamic Inflammation and Energy Balance Disruptions: Spotlight on Chemokines. *Frontiers in Endocrinology*, 8, 197. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00197>
- Lee, S. (1993). How abnormal is the desire for slimness? A survey of eating attitudes and behaviour among Chinese undergraduates in Hong Kong. *Psychological Medicine*, 23(2), 437–451. <https://doi.org/DOI:10.1017/S0033291700028531>
- Lee, S. J., Kirigiti, M., Lindsley, S. R., Loche, A., Madden, C. J., Morrison, S. F., ... Grove, K. L. (2013). Efferent projections of neuropeptide Y-expressing neurons of the dorsomedial hypothalamus in chronic hyperphagic models. *The Journal of Comparative Neurology*, 521(8), 1891–1914. <https://doi.org/10.1002/cne.23265>
- Lee, S., Ng, K. L., Kwok, K. P. S., Thomas, J. J., & Becker, A. E. (2012). Gastrointestinal dysfunction in Chinese patients with fat-phobic and nonfat-phobic anorexia nervosa. *Transcultural Psychiatry*, 49(5), 678–695. <https://doi.org/10.1177/1363461512459487>
- Levitsky, D., & Collier, G. (1968). Schedule-induced wheel running. *Physiology & Behavior*, 3(4), 571–573. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9384\(68\)90015-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9384(68)90015-2)

- Lightbourne, M., & Brown, R. J. (2017). Genetics of Lipodystrophy. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 46(2), 539–554. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2017.01.012>
- Lipovka, Y., & Konhilas, J. P. (2015). AMP-Activated Protein Kinase Signalling in Cancer and Cardiac Hypertrophy. *Cardiovascular Pharmacology: Open Access*, 4(3), 154. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26798768>
- Loeb, L. (1964). The Clinical Course of Anorexia Nervosa. *Psychosomatics*, 5(6), 345–347. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0033-3182\(64\)72359-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0033-3182(64)72359-6)
- Lopez, M. (2016, May). Hypothalamic Leptin Resistance: From BBB to BBSome. *PLoS Genetics*. United States. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005980>
- Lopez, M. (2017). EJE PRIZE 2017: Hypothalamic AMPK: a golden target against obesity? *European Journal of Endocrinology*, 176(5), R235–R246. <https://doi.org/10.1530/EJE-16-0927>
- López, M. (2018a). Hypothalamic AMPK and energy balance. *European Journal of Clinical Investigation*, 48(9), e12996. <https://doi.org/10.1111/eci.12996>
- López, M. (2018b). AMPK Wars: the VMH Strikes Back, Return of the PVH. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 29(3), 135–137. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.01.004>
- Lopez, M. (2018c). Central leptin and autonomic regulation: A melanocortin business. *Molecular Metabolism*, 8, 211–213. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.01.001>
- Lopez, M., Alvarez, C. V, Nogueiras, R., & Dieguez, C. (2013). Energy balance regulation by thyroid hormones at central level. *Trends in Molecular Medicine*, 19(7), 418–427. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.04.004>
- Lopez, M., Lage, R., Saha, A. K., Perez-Tilve, D., Vazquez, M. J., Varela, L., ... Vidal-Puig, A. (2008). Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell Metabolism*, 7(5), 389–399. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.03.006>
- Lopez, M., Lelliott, C. J., Tovar, S., Kimber, W., Gallego, R., Virtue, S., ... Vidal-Puig, A. J. (2006). Tamoxifen-induced anorexia is associated with fatty acid synthase inhibition in the ventromedial nucleus of the hypothalamus and accumulation of malonyl-CoA. *Diabetes*, 55(5), 1327–1336.
- Lopez, M., Lelliott, C. J., & Vidal-Puig, A. (2007). Hypothalamic fatty acid metabolism: a housekeeping pathway that regulates food intake. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 29(3), 248–261. <https://doi.org/10.1002/bies.20539>
- Lopez, M., Nogueiras, R., Tena-Sempere, M., & Dieguez, C. (2016). Hypothalamic AMPK: a canonical regulator of whole-body energy balance. *Nature Reviews. Endocrinology*, 12(7), 421–432. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.67>
- Lopez, M., Seoane, L., Garcia, M. C., Lago, F., Casanueva, F. F., Senaris, R., & Dieguez, C. (2000). Leptin regulation of prepro-orexin and orexin receptor mRNA levels in the hypothalamus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 269(1), 41–45. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2245>

- Lopez, M., Varela, L., Vazquez, M. J., Rodriguez-Cuenca, S., Gonzalez, C. R., Velagapudi, V. R., ... Vidal-Puig, A. (2010). Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nature Medicine*, *16*(9), 1001–1008. <https://doi.org/10.1038/nm.2207>
- Lorand, S. (1943). Anorexia nervosa: Report of a case. *Psychosomatic Medicine*, *5*, 282–292.
- Lorand, S. (1964). The clinical course of anorexia nervosa. *Psychosomatics*, *5*, 345–347.
- Lowell, B. B., & Spiegelman, B. M. (2000). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*, *404*(6778), 652.
- Luck, P., & Wakeling, A. (1980). Altered thresholds for thermoregulatory sweating and vasodilatation in anorexia nervosa. *British Medical Journal*, *281*(6245), 906 LP-908. <https://doi.org/10.1136/bmj.281.6245.906>
- Luck, P., & Wakeling, A. (1981). Increased Cutaneous Vasoreactivity to Cold in Anorexia Nervosa. *Clinical Science*, *61*(5), 559 LP-567. <https://doi.org/10.1042/cs0610559>
- Luck, P., & Wakeling, A. (1982). Set-Point Displacement for Behavioural Thermoregulation in Anorexia Nervosa. *Clinical Science*, *62*(6), 677 LP-682. <https://doi.org/10.1042/cs0620677>
- Luheshi, G. N., Gardner, J. D., Rushforth, D. A., Loudon, A. S., & Rothwell, N. J. (1999). Leptin actions on food intake and body temperature are mediated by IL-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(12), 7047-7052. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.12.7047>
- Lyons, W. E., Mamounas, L. A., Ricaurte, G. A., Coppola, V., Reid, S. W., Bora, S. H., ... Tessarollo, L. (1999). Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(26), 15239–15244.
- Madden, S., Miskovic-Wheatley, J., Wallis, A., Kohn, M., Lock, J., Le Grange, D., ... Touyz, S. (2015). A randomized controlled trial of in-patient treatment for anorexia nervosa in medically unstable adolescents. *Psychological Medicine*, *45*(2), 415–427. <https://doi.org/DOI: 10.1017/S0033291714001573>
- Mahmood, T., & Yang, P.-C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, *4*(9), 429–434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Makenzie, S. A. (1888). A case of anorexia nervosa vel hysterica. *Lancet*, *1*, 613–614.
- Maltais, L. J., Lane, P. W., & Beamer, W. G. (1984). Anorexia, a recessive mutation causing starvation in preweanling mice. *Journal of Heredity*, *75*(6), 468–472. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a109987>
- Marce, L. V. (1860). Note sur une forme de déliere hypochondriaque consécutive aux dyspepsies et caractérisée principalement par le refus d'aliments. *Annales Médico Psychologiques*, *6*, 15–28.
- Marks, J. L., Porte, D. J., Stahl, W. L., & Baskin, D. G. (1990). Localization of insulin receptor

- mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology*, *127*(6), 3234–3236. <https://doi.org/10.1210/endo-127-6-3234>
- Marrazzi, M. A., Mullings-Britton, J., Stack, L., Powers, R. J., Lawhorn, J., Graham, V., ... Gunter, S. (1990). Atypical endogenous opioid systems in mice in relation to an auto-addiction opioid model of anorexia nervosa. *Life Sciences*, *47*(16), 1427–1435. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(90\)90521-R](https://doi.org/10.1016/0024-3205(90)90521-R)
- Martín-Moreno, G. A., Barrios, V., & Argente, J. (2006). Mecanismos reguladores del metabolismo energético. *Anales de Pediatría*, *64*(2), 535–538.
- Martin Monzon, B., Hay, P., Foroughi, N., & Touyz, S. (2016). White matter alterations in anorexia nervosa: A systematic review of diffusion tensor imaging studies. *World Journal of Psychiatry*, *6*(1), 177–186. <https://doi.org/10.5498/wjp.v6.i1.177>
- Martinez-Sanchez, N., Seoane-Collazo, P., Contreras, C., Varela, L., Villarroya, J., Rial-Pensado, E., ... Lopez, M. (2017). Hypothalamic AMPK-ER Stress-JNK1 Axis Mediates the Central Actions of Thyroid Hormones on Energy Balance. *Cell Metabolism*, *26*(1), 212–229.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.06.014>
- Martinez de Morentin, P. B., Gonzalez-Garcia, I., Martins, L., Lage, R., Fernandez-Mallo, D., Martinez-Sanchez, N., ... Lopez, M. (2014). Estradiol regulates brown adipose tissue thermogenesis via hypothalamic AMPK. *Cell Metabolism*, *20*(1), 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.031>
- Martinez de Morentin, P. B., Lage, R., Gonzalez-Garcia, I., Ruiz-Pino, F., Martins, L., Fernandez-Mallo, D., ... Lopez, M. (2015). Pregnancy induces resistance to the anorectic effect of hypothalamic malonyl-CoA and the thermogenic effect of hypothalamic AMPK inhibition in female rats. *Endocrinology*, *156*(3), 947–960. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1611>
- Martinez de Morentin, P. B., Urisarri, A., Couce, M. L., & Lopez, M. (2016). Molecular mechanisms of appetite and obesity: a role for brain AMPK. *Clinical Science (London, England : 1979)*, *130*(19), 1697–1709. <https://doi.org/10.1042/CS20160048>
- Martinez de Morentin, P. B., Whittle, A. J., Ferno, J., Nogueiras, R., Dieguez, C., Vidal-Puig, A., & Lopez, M. (2012). Nicotine induces negative energy balance through hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Diabetes*, *61*(4), 807–817. <https://doi.org/10.2337/db11-1079>
- Martins, L., Seoane-Collazo, P., Contreras, C., Gonzalez-Garcia, I., Martinez-Sanchez, N., Gonzalez, F., ... Lopez, M. (2016). A Functional Link between AMPK and Orexin Mediates the Effect of BMP8B on Energy Balance. *Cell Reports*, *16*(8), 2231–2242. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.045>
- Mathes, W. F., & Kanarek, R. B. (2006). Chronic running wheel activity attenuates the antinociceptive actions of morphine and morphine-6-glucuronide administration into the periaqueductal gray in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *83*(4), 578–584. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.03.020>
- Matzkin, V. B., Geissler, C., Coniglio, R., Selles, J., & Bello, M. (2006). Cholesterol concentrations in patients with Anorexia Nervosa and in healthy controls. *The International Journal of Psychiatric Nursing Research*, *11*(2), 1283–1293. Retrieved from

<http://europepmc.org/abstract/MED/16459892>

- Mayer-Davis, E. J., D'Agostino Ralph, J., Karter, A. J., Haffner, S. M., Rewers, M. J., Saad, M., ... Investigators, for the I. (1998). Intensity and Amount of Physical Activity in Relation to Insulin SensitivityThe Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *JAMA*, 279(9), 669–674. <https://doi.org/10.1001/jama.279.9.669>
- Mayer, J. (1963). Anorexia Nervosa. *Postgraduate Medicine*, 34, 529–534.
- McClellan, K. M., Parker, K. L., & Tobet, S. (2006). Development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 27(2), 193–209. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2006.02.002>
- McCullagh, E. P., & Tupper, W. R. (1940). Anorexia nervosa. *Annals of Internal Medicine*, 14, 817–838.
- McIntosh, V. V. W., Jordan, J., Carter, F. A., Luty, S. E., McKenzie, J. M., Bulik, C. M., ... Joyce, P. R. (2005). Three Psychotherapies for Anorexia Nervosa: A Randomized, Controlled Trial. *American Journal of Psychiatry*, 162(4), 741–747. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.162.4.741>
- Meczekalski, B., Podfigurna-Stopa, A., & Katulski, K. (2013). Long-term consequences of anorexia nervosa. *Maturitas*, 75(3), 215–220. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2013.04.014>
- Meek, T.H., Dlugosz, E.M., Vu, K.T., and Garland, T., Jr. (2012). Effects of leptin treatment and Western diet on wheel running in selectively bred high runner mice. *Physiology & Behavior*, 106, 252–258. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.02.012>
- Mehler, P. S., & Brown, C. (2015). Anorexia nervosa – medical complications. *Journal of Eating Disorders*, 3(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s40337-015-0040-8>
- Mercer, A. J., Hentges, S. T., Meshul, C. K., & Low, M. J. (2013). Unraveling the central proopiomelanocortin neural circuits. *Frontiers in Neuroscience*, 7, 19. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00019>
- Mercken, E. M., Carboneau, B. A., Krzysik-Walker, S. M., & de Cabo, R. (2012). Of mice and men: The benefits of caloric restriction, exercise, and mimetics. *Ageing Research Reviews*, 11(3), 390–398. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arr.2011.11.005>
- Meyer, C., Taranis, L., & Touyz, S. (2008). Excessive exercise in the eating disorders: a need for less activity from patients and more from researchers.... *European Eating Disorders Review*, 16(2), 81–83. <https://doi.org/10.1002/erv.863>
- Micali, N., Hagberg, K. W., Petersen, I., & Treasure, J. L. (2013). The incidence of eating disorders in the UK in 2000–2009: findings from the General Practice Research Database. *BMJ Open*, 3(5), e002646. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2013-002646>
- Milanese, C., Pellegrini, M., Battistini, N. C., Dalle Grave, R., Calugi, S., & El Ghoch, M. (2014). Body composition, eating disorder psychopathology, and psychological distress in anorexia nervosa: a longitudinal study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 99(4), 771–778. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.078816>
- Miniati, M., & Marazziti, D. (2017). Psychopharmacological options for adult patients with

- anorexia nervosa: the patients' and carers' perspectives integrated by the spectrum model. *CNS Spectrums*, 1–2. <https://doi.org/10.1017/S1092852917000700>
- Miniati, M., Mauri, M., Ciberti, A., Mariani, M. G., Marazziti, D., & Dell'Osso, L. (2016). Psychopharmacological options for adult patients with anorexia nervosa. *CNS Spectrums*, 21(2), 134–142. <https://doi.org/10.1017/S1092852914000790>
- Minokoshi, Y., Alquier, T., Furukawa, N., Kim, Y.-B., Lee, A., Xue, B., ... Kahn, B. B. (2004). AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature*, 428, 569. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nature02440>
- Misra, M., Miller, K. K., Kuo, K., Griffin, K., Stewart, V., Hunter, E., ... Klibanski, A. (2005). Secretory dynamics of leptin in adolescent girls with anorexia nervosa and healthy adolescents. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 289(3), E373–E381. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00041.2005>
- Misra, M., Soyka, L. A., Miller, K. K., Grinspoon, S., Levitsky, L. L., & Klibanski, A. (2003). Regional body composition in adolescents with anorexia nervosa and changes with weight recovery. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(6), 1361–1367. <https://doi.org/10.1093/ajcn/77.6.1361>
- Mitchell, A. M., & Bulik, C. M. (2006). Eating Disorders and Women's Health: An Update. *Journal of Midwifery & Women's Health*, 51(3), 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.jmwh.2006.01.005>
- Mitchell, J. E., Cook-Myers, T., & Wonderlich, S. A. (2005). Diagnostic criteria for anorexia nervosa: Looking ahead to DSM-V. *International Journal of Eating Disorders*, 37(S1), S95–S97. <https://doi.org/10.1002/eat.20125>
- Mitchison, D., & Hay, P. J. (2014). The epidemiology of eating disorders: genetic, environmental, and societal factors. *Clinical Epidemiology*, 6, 89–97. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S40841>
- Moellering, D. R., & Smith, D. L. (2012). Ambient Temperature and Obesity. *Current Obesity Reports*, 1(1), 26–34. <https://doi.org/10.1007/s13679-011-0002-7>
- Mondon, C. E., Dolkas, C. B., Sims, C. y Reaven, G. M. (1985). Spontaneous running activity in male rats: Effect of age. *Journal of Applied Physiology*, 58, 1553–1557. <https://doi.org/10.1152/jappl.1985.58.5.1553>
- Monge, M. C., Forman, S. F., McKenzie, N. M., Rosen, D. S., Mammel, K. A., Callahan, S. T., ... & Romano, M. E. (2015). Use of psychopharmacologic medications in adolescents with restrictive eating disorders: analysis of data from the National Eating Disorder Quality Improvement Collaborative. *Journal of Adolescent Health*, 57(1), 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.jadohealth.2015.03.021>
- Monnikes, H., Heymann-Monnikes, I., & Tache, Y. (1992). CRF in the paraventricular nucleus of the hypothalamus induces dose-related behavioral profile in rats. *Brain Research*, 574(1–2), 70–76.
- Morimoto, C., Kameda, K., Tsujita, T., & Okuda, H. (2001). Relationships between lipolysis induced by various lipolytic agents and hormone-sensitive lipase in rat fat cells. *Journal of Lipid Research*, 42(1), 120–127.

- Morlock, C. G. (1939). Anorexia Nervosa. *Proc.Staff. Meet. Mayo Clinic*, 14, 24.
- Morrison, S. F., Madden, C. J., & Tupone, D. (2012). An orexinergic projection from perifornical hypothalamus to raphe pallidus increases rat brown adipose tissue thermogenesis. *Adipocyte*, 1(2), 116–120. <https://doi.org/10.4161/adip.19736>
- Morrison, S. F., Madden, C. J., & Tupone, D. (2014). Central Neural Regulation of Brown Adipose Tissue Thermogenesis and Energy Expenditure. *Cell Metabolism*, 19(5), 741–756. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.02.007>
- Morrow, N. S., Schall, M., Grijalva, C. V., Geiselman, P. J., Garrick, T., Nuccion, S., & Novin, D. (1997). Body Temperature and Wheel Running Predict Survival Times in Rats Exposed to Activity-Stress. *Physiology & Behavior*, 62(4), 815–825. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(97\)00243-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9384(97)00243-6)
- Morse, A. D., Russell, J. C., Hunt, T. W., Wood, G. O., Epling, W. F., & Pierce, W. D. (1995). Diurnal variation of intensive running in food-deprived rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 73(10), 1519-1523. <https://doi.org/10.1139/y95-210>
- Monteleone, A. M., Monteleone, P., Serino, I., Amodio, R., Monaco, F., & Maj, M. (2016). Underweight subjects with anorexia nervosa have an enhanced salivary cortisol response not seen in weight restored subjects with anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology*, 70, 118-121. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.05.004>
- Morton, G. J., Kaiyala, K. J., Fisher, J. D., Ogimoto, K., Schwartz, M. W., & Wisse, B. E. (2010). Identification of a physiological role for leptin in the regulation of ambulatory activity and wheel running in mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 300(2), E392-E401. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00546.2010>
- Morton, G. J., Meek, T. H., & Schwartz, M. W. (2014). Neurobiology of food intake in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 15, 367. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nrn3745>
- Morton, R. (1694). *Physiological: or a treatise of Consumption*.
- Moulton, R. (1942). A psychosomatic study of anorexia nervosa including the use of vagina smears. *Psychosomatic Medicine*, 4, 62–73.
- Mrosovsky, N. (1984). Animal models: Anorexia yes, nervosa no. En K. M. Pirke & D. Ploog (Eds.), *The psychobiology of anorexia nervosa* (pp. 22-34). New York: Springer-Verlag.
- Murphy, M., & Ebling, F. J. P. (2011). The role of hypothalamic tri-iodothyronine availability in seasonal regulation of energy balance and body weight. *Journal of Thyroid Research*, 2011, 387562. <https://doi.org/10.4061/2011/387562>
- Nakamura, Y., & Nakamura, K. (2018). Central regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy homeostasis dependent on food availability. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 470(5), 823–837. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-2090-z>
- Narayanan, V., Gaudiani, J. L., Harris, R. H., & Mehler, P. S. (2010). Liver function test abnormalities in anorexia nervosa—Cause or effect. *International Journal of Eating Disorders*, 43(4), 378–381. <https://doi.org/10.1002/eat.20690>

- Nedergaard, J., Bengtsson, T., & Cannon, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 293(2), E444-52. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00691.2006>
- Nedergaard, J., & Cannon, B. (2018). Chapter 9 - Brown adipose tissue as a heat-producing thermoeffector. In A. A. B. T.-H. of C. N. Romanovsky (Ed.), *Thermoregulation: From Basic Neuroscience to Clinical Neurology Part I* (Vol. 156, pp. 137–152). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63912-7.00009-6>
- Nemiah, J. (1958). Anorexia nervosa: Fact and Theory. *American Journal of Digestive Diseases*, 3, 249–274.
- Nestel, P. . (1974). Cholesterol Metabolism in Anorexia Nervosa and Hypercholesterolemia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 38(2), 325–328. <https://doi.org/10.1210/jcem-38-2-325>
- Nguyen, A. D., Mitchell, N. F., Lin, S., Macia, L., Yulyaningsih, E., Baldock, P. A., ... Sainsbury, A. (2012). Y1 and Y5 receptors are both required for the regulation of food intake and energy homeostasis in mice. *PloS One*, 7(6), e40191. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040191>
- Nicholls, D. G., & Locke, R. M. (1984). Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiological Reviews*, 64(1), 1–64. <https://doi.org/10.1152/physrev.1984.64.1.1>
- Nilius, B., & Flockerzi, V. (2014). Mammalian transient receptor potential (TRP) cation channels. Preface. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Germany.
- Nilsson, I. A. K. (2019). The anx/anx Mouse - A Valuable Resource in Anorexia Nervosa Research. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 59. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00059>
- Nixon, J. P., Kotz, C. M., Novak, C. M., Billington, C. J., & Teske, J. A. (2012). Neuropeptides controlling energy balance: orexins and neuromedins. *Handbook of Experimental Pharmacology*, (209), 77–109. https://doi.org/10.1007/978-3-642-24716-3_4
- Nobis, S., Goichon, A., Achamrah, N., Guerin, C., Azhar, S., Chan, P., ... Coeffier, M. (2018). Alterations of proteome, mitochondrial dynamic and autophagy in the hypothalamus during activity-based anorexia. *Scientific Reports*, 8(1), 7233. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25548-9>
- Noble, E. E., Billington, C. J., Kotz, C. M., & Wang, C. (2014). Oxytocin in the ventromedial hypothalamic nucleus reduces feeding and acutely increases energy expenditure. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 307(6), R737-45. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00118.2014>
- Nogueira, J.-P., Maraninchi, M., Lorec, A.-M., Corroller, A. B.-L., Nicolay, A., Gaudart, J., ... Valéro, R. (2010). Specific adipocytokines profiles in patients with hyperactive and/or binge/purge form of anorexia nervosa. *European Journal Of Clinical Nutrition*, 64, 840. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/ejcn.2010.66>
- Nusbaum, J. G., & Drever, E. (1990). Inpatient Survey of Nursing Care Measures for Treatment of Patients with Anorexia Nervosa. *Issues in Mental Health Nursing*, 11(2), 175–184. <https://doi.org/10.3109/01612849009014552>
- O'Hara, C. B., Campbell, I. C., & Schmidt, U. (2015). A reward-centred model of anorexia

- nervosa: a focussed narrative review of the neurological and psychophysiological literature. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 52, 131–152. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.02.012>
- Ohwada, R., Hotta, M., Oikawa, S., & Takano, K. (2006). Etiology of hypercholesterolemia in patients with anorexia nervosa. *International Journal of Eating Disorders*, 39(7), 598–601. <https://doi.org/10.1002/eat.20298>
- Ollmann, M. M., Wilson, B. D., Yang, Y. K., Kerns, J. A., Chen, Y., Gantz, I., & Barsh, G. S. (1997). Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science (New York, N.Y.)*, 278(5335), 135–138.
- Organización Mundial de la Salud. (1992). CIE-10. *Clasificación Internacional de Enfermedades (10ª edición)*. Madrid: Meditor.
- Palkovits, M. (2003). Hypothalamic regulation of food intake. *Ideggyogyaszati Szemle*, 56(9–10), 288–302. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/14608950>
- Palmer, H. D., & Jones, M. S. (1939). Anorexia nervosa as a manifestation of compulsión neurosis: A study of psychogenic factors. *Archives of Neurology and Psychiatry*, 41, 856–858.
- Palmer, R. L. (1993). Weight concern should not be a necessary criterion for the eating disorders: A polemic. *International Journal of Eating Disorders*, 14(4), 459–465. [https://doi.org/10.1002/1098-108X\(199312\)14:4<459::AID-EAT2260140409>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1098-108X(199312)14:4<459::AID-EAT2260140409>3.0.CO;2-V)
- Pandit, R., Beerens, S., & Adan, R. A. H. (2017). Role of leptin in energy expenditure: the hypothalamic perspective. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 312(6), R938–R947. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00045.2016>
- Pandit, R., de Jong, J. W., Vanderschuren, L. J. M. J., & Adan, R. A. H. (2011). Neurobiology of overeating and obesity: the role of melanocortins and beyond. *European Journal of Pharmacology*, 660(1), 28–42. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.01.034>
- Parde, I. (1941). Cachexia (anorexia) nervosa. *Medical Clinics of North America*, 25, 755–773.
- Paré, W. P. (1977). Body temperature and the activity-stress ulcer in the rat. *Physiology & Behavior*, 18(2), 219–223. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9384\(77\)90125-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9384(77)90125-1)
- Paré, W. P. (1989). “Behavioral despair” test predicts stress ulcer in WKY rats. *Physiology & Behavior*, 46(3), 483–487. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9384\(89\)90025-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9384(89)90025-5)
- Paré, W. P., & Houser, V. P. (1973). Activity and food-restriction effects on gastric glandular lesions in the rat: The activity-stress ulcer. *Bulletin of the Psychonomic Society*, 2(4), 213–214. <https://doi.org/10.3758/BF03329249>
- Patel, J. D., & Ebenezer, I. S. (2008). The effect of intraperitoneal administration of leptin on short-term food intake in rats. *European journal of pharmacology*, 580(1-2), 143-152. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.10.046>
- Patterson, W. (1939). Discussion on anorexia nervosa. *Proceeding of the Royal Society of Medicine*, 32, 745–746.

- Paxinos, G., & Watson, C. (2013). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates 7th Edition*. (Academic Press, Ed.).
- Pelleymounter, M. A., Cullen, M. J., Baker, M. B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T., & Collins, F. (1995). Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*, 269(5223), 540-543. DOI: 10.1126/science.7624776
- Peyron, C., Tighe, D. K., van den Pol, A. N., de Lecea, L., Heller, H. C., Sutcliffe, J. G., & Kilduff, T. S. (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(23), 9996–10015.
- Pierce, W. D. y Epling, W. F. (1991). Activity anorexia: An animal model and theory of human self- starvation. En A. Boulton, G. Baker y M. Martin- Iverson. (Eds.), *Neuromethods, Vol 19,. Animal Models in Psychiatry, II*. Clifton, NJ: The Humana Press.
- Pike, K. M., Walsh, B. T., Vitousek, K., Wilson, G. T., & Bauer, J. (2003). Cognitive Behavior Therapy in the Posthospitalization Treatment of Anorexia Nervosa. *American Journal of Psychiatry*, 160(11), 2046–2049. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.160.11.2046>
- Porter, C., Chondronikola, M., & Sidossis, L. S. (2015). The Therapeutic Potential of Brown Adipocytes in Humans. *Frontiers in Endocrinology*, 6, 156. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00156>
- Poyastro Pinheiro, A., Thornton, L. M., Plotniconov, K. H., Tozzi, F., Klump, K. L., Berrettini, W. H., ... Bulik, C. M. (2007). Patterns of menstrual disturbance in eating disorders. *International Journal of Eating Disorders*, 40(5), 424–434. <https://doi.org/10.1002/eat.20388>
- Qi, J., Gong, J., Zhao, T., Zhao, J., Lam, P., Ye, J., ... Li, P. (2008). Downregulation of AMP-activated protein kinase by Cidea-mediated ubiquitination and degradation in brown adipose tissue. *The EMBO Journal*, 27(11), 1537–1548. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.92>
- Qu, D., Ludwig, D. S., Gammeltoft, S., Piper, M., Pelleymounter, M. A., Cullen, M. J., ... Maratos-Flier, E. (1996). A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature*, 380(6571), 243–247. <https://doi.org/10.1038/380243a0>
- Raevuori, A., Hoek, H. W., Susser, E., Kaprio, J., Rissanen, A., & Keski-Rahkonen, A. (2009). Epidemiology of Anorexia Nervosa in Men: A Nationwide Study of Finnish Twins. *PLOS ONE*, 4(2), e4402. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004402>
- Raevuori, A., Keski-Rahkonen, A., & Hoek, H. W. (2014). A review of eating disorders in males. *Current Opinion in Psychiatry*, 27(6). Retrieved from https://journals.lww.com/psychiatry/Fulltext/2014/11000/A_review_of_eating_disorders_in_males.8.aspx
- Rautou, P.-E., Cazals-Hatem, D., Moreau, R., Francoz, C., Feldmann, G., Lebrec, D., ... Durand, F. (2008). Acute liver cell damage in patients with anorexia nervosa: a possible role of starvation-induced hepatocyte autophagy. *Gastroenterology*, 135(3), 840–848, 848.e1-3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.05.055>
- Rauh, M. J., Nichols, J. F., & Barrack, M. T. (2010). Relationships among injury and disordered

- eating, menstrual dysfunction, and low bone mineral density in high school athletes: a prospective study. *Journal of athletic training*, 45(3), 243-252.
- Richardson, H. B. (1939). Simmonds disease and anorexia nervosa. *Archives of Internal Medicine*, 63, 1–28.
- Richter, C. P. (1992). No TitleA behavioristic study of the activity of the rat. *Journal of Comparative Psychology Monographs*, 1, 1–55.
- Richy, S., Burlet, A., Max, J. P., Burlet, C., & Beck, B. (2000). Effect of chronic intraperitoneal injections of leptin on hypothalamic neurotensin content and food intake. *Brain research*, 862(1-2), 276-279. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02125-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02125-9)
- Rigaud, D., Boulier, A., Tallonneau, I., Brindisi, M. C., & Rozen, R. (2010). Body fluid retention and body weight change in anorexia nervosa patients during refeeding. *Clinical Nutrition*, 29(6), 749–755. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.clnu.2010.05.007>
- Rijke, C. E. de, Hillebrand, J. J. G., Verhagen, L. A. W., Roeling, T. A. P., & Adan, R. A. H. (2005). Hypothalamic neuropeptide expression following chronic food restriction in sedentary and wheel-running rats. *Journal of Molecular Endocrinology*, 35(2), 381–390. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01808>
- Rivest, S., & Richard, D. (1990). Involvement of corticotropin-releasing factor in the anorexia induced by exercise. *Brain Research Bulletin*, 25(1), 169–172. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0361-9230\(90\)90270-A](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0361-9230(90)90270-A)
- Roberto CA, Mayer LE, Brickman AM, Barnes A, Muraskin J, Yeung LK, Steffener J, Sy M, Hirsch J, Stern Y, et al. (2011). Brain tissue volume changes following weight gain in adults with anorexia nervosa. *International Journal of Eating Disorders*, 44(5):406–411. <https://doi.org/10.1002/eat.20840>
- Roberto, C. A., Steinglass, J., Mayer, L. E. S., Attia, E., & Walsh, B. T. (2008). The clinical significance of amenorrhea as a diagnostic criterion for anorexia nervosa. *International Journal of Eating Disorders*, 41(6), 559–563. <https://doi.org/10.1002/eat.20534>
- Romero-Pico, A., Sanchez-Rebordelo, E., Imbernon, M., Gonzalez-Touceda, D., Folgueira, C., Senra, A., ... Dieguez, C. (2018). Melanin-Concentrating Hormone acts through hypothalamic kappa opioid system and p70S6K to stimulate acute food intake. *Neuropharmacology*, 130, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.11.040>
- Ross, R. A., Mandelblat-Cerf, Y., & Verstegen, A. M. J. (2016). Interacting Neural Processes of Feeding, Hyperactivity, Stress, Reward, and the Utility of the Activity-Based Anorexia Model of Anorexia Nervosa. *Harvard Review of Psychiatry*, 24(6), 416–436. <https://doi.org/10.1097/HRP.0000000000000111>
- Routtenberg, A., & Kuznesof, A. W. (1967). Self-starvation of rats living in activity wheels on a restricted feeding schedule. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. US: American Psychological Association. <https://doi.org/10.1037/h0025205>
- Ruffin, M. P., & Nicolaidis, S. (2000). Intracerebroventricular injection of murine leptin enhances the postprandial metabolic rate in the rat. *Brain research*, 874(1), 30-36. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02570-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02570-1)
- Rui, L. (2013). Brain regulation of energy balance and body weight. *Reviews in Endocrine &*

- Metabolic Disorders*, 14(4), 387–407. <https://doi.org/10.1007/s11154-013-9261-9>
- Rui, L. (2014, January 10). Energy Metabolism in the Liver. *Comprehensive Physiology*. <https://doi.org/doi:10.1002/cphy.c130024>
- Russell, G. F. M. (1984). The modern history of anorexia nervosa. *Aktuelle Ernährungs-Medizin*, 9, 3–7.
- Russell, G. F. M. (1985). The changing nature of anorexia nervosa: An introduction to the conference. *Journal of Psychiatric Research*, 19(101–109).
- Russell, G. F. M. (1995). *Anorexia nervosa through time. Handbook of eating disorders: Theory, treatment and research*.
- RUSSELL, G. F. M., & TREASURE, J. (1989). The Modern History of Anorexia Nervosa An Interpretation of Why the Illness Has Changed. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 575(1), 13–30. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1989.tb53228.x>
- Ryle, J. . (1936). Anorexia nervosa. *Lancet*, 2, 893–899.
- Ryle, J. A. (1939). Discussion on anorexia nervosa. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 32, 735–746.
- Saegusa, Y., Takeda, H., Muto, S., Nakagawa, K., Ohnishi, S., Sadakane, C., ... Asaka, M. (2011). Decreased plasma ghrelin contributes to anorexia following novelty stress. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 301(4), E685–E696. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00121.2011>
- Sakurada, S., Shido, O., Sugimoto, N., Hiratsuka, Y., Yoda, T., & Kanosue, K. (2000). Autonomic and behavioural thermoregulation in starved rats. *The Journal of Physiology*, 526 Pt 2, 417–424.
- Sakurai, T. (2014). The role of orexin in motivated behaviours. *Nature Reviews. Neuroscience*, 15(11), 719–731. <https://doi.org/10.1038/nrn3837>
- Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R. M., Tanaka, H., ... Yanagisawa, M. (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92(4), 573–585.
- Sanders, M. J., Grondin, P. O., Hegarty, B. D., Snowden, M. A., & Carling, D. (2007). Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *The Biochemical Journal*, 403(1), 139–148. <https://doi.org/10.1042/BJ20061520>
- Saper, C. B., & Lowell, B. B. (2014). The hypothalamus. *Current Biology : CB*, 24(23), R1111–6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.10.023>
- Sarmiento, U., Benson, B., Kaufman, S., Ross, L., Qi, M., Scully, S., & DiPalma, C. (1997). Morphologic and molecular changes induced by recombinant human leptin in the white and brown adipose tissues of C57BL/6 mice. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 77(3), 243–256.
- Satoh, N., Ogawa, Y., Katsuura, G., Hayase, M., Tsuji, T., Imagawa, K., ... & Nakao, K. (1997). The arcuate nucleus as a primary site of satiety effect of leptin in rats. *Neuroscience letters*,

- 224(3), 149-152. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(97\)00163-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(97)00163-8)
- Sauro, C. L., Ravaldi, C., Cabras, P. L., Faravelli, C., & Ricca, V. (2008). Stress, hypothalamic-pituitary-adrenal axis and eating disorders. *Neuropsychobiology*, *57*(3), 95-115. <https://doi.org/10.1159/000138912>
- Scarpace, P. J., & Matheny, M. (1998). Leptin induction of UCP1 gene expression is dependent on sympathetic innervation. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, *275*(2), E259-E264. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1998.275.2.E259>
- Scarpace, P. J., Matheny, M., Pollock, B. H., & Tumer, N. (1997). Leptin increases uncoupling protein expression and energy expenditure. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, *273*(1), E226-E230. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1997.273.1.E226>
- Scarpace, P. J., Nicolson, M., & Matheny, M. (1998). UCP2, UCP3 and leptin gene expression: modulation by food restriction and leptin. *Journal of Endocrinology*, *159*(2), 349-357. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1590349>
- Schebendach, J. E., Klein, D. A., Foltin, R. W., Devlin, M. J., & Walsh, B. T. (2007). Relative reinforcing value of exercise in inpatients with anorexia nervosa: Model development and pilot data. *International Journal of Eating Disorders*, *40*(5), 446-453. <https://doi.org/10.1002/eat.20392>
- Scherma, M., Satta, V., Collu, R., Boi, M. F., Usai, P., Fratta, W., & Fadda, P. (2017). Cannabinoid CB1 /CB2 receptor agonists attenuate hyperactivity and body weight loss in a rat model of activity-based anorexia. *British Journal of Pharmacology*, *174*(16), 2682-2695. <https://doi.org/10.1111/bph.13892>
- Schmidt, U., Adan, R., Bohm, I., Campbell, I. C., Dingemans, A., Ehrlich, S., ... Zipfel, S. (2016). Eating disorders: the big issue. *The Lancet. Psychiatry*, *3*(4), 313-315. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)00081-X](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(16)00081-X)
- Schneeberger, M., Gomis, R., & Claret, M. (2014). Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. *Journal of Endocrinology*, *220*(2), T25-T46. <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0398>
- Schreiber, R., Diwoky, C., Schoiswohl, G., Feiler, U., Wongsiriroj, N., Abdellatif, M., ... Zechner, R. (2017). Cold-Induced Thermogenesis Depends on ATGL-Mediated Lipolysis in Cardiac Muscle, but Not Brown Adipose Tissue. *Cell Metabolism*, *26*(5), 753-763.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.09.004>
- Schwartz, M. W., Peskind, E., Raskind, M., Boyko, E. J., & Porte, D. J. (1996). Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nature Medicine*, *2*(5), 589-593.
- Schwartz, M. W., Seeley, R. J., Woods, S. C., Weigle, D. S., Campfield, L. A., Burn, P., & Baskin, D. G. (1997). Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes*, *46*(12), 2119-2123.
- Schwartz, M. W., Sipols, A. J., Marks, J. L., Sanacora, G., White, J. D., Scheurink, A., ... Figlewicz, D. P. (1992). Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology*, *130*(6), 3608-3616. <https://doi.org/10.1210/endo.130.6.1597158>

- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte Jr, D., Seeley, R. J., & Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, *404*, 661. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/35007534>
- Seeley, R. J., Van Dijk, G., Campfield, L. A., Smith, F. J., Burn, P., Nelligan, J. A., ... & Schwartz, M. W. (1996). Intraventricular leptin reduces food intake and body weight of lean rats but not obese Zucker rats. *Hormone and Metabolic Research*, *28*(12), 664-668. DOI: 10.1055/s-2007-979874
- Segal, J. P., Stallings, N. R., Lee, C. E., Zhao, L., Socci, N., Viale, A., ... Friedman, J. M. (2005). Use of laser-capture microdissection for the identification of marker genes for the ventromedial hypothalamic nucleus. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *25*(16), 4181-4188. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0158-05.2005>
- Seitz, J., Herpertz-Dahlmann, B., & Konrad, K. (2016). Brain morphological changes in adolescent and adult patients with anorexia nervosa. *Journal of Neural Transmission*, *123*(8), 949-959. <https://doi.org/10.1007/s00702-016-1567-9>
- Seoane-Collazo, P., Ferno, J., Gonzalez, F., Dieguez, C., Leis, R., Nogueiras, R., & Lopez, M. (2015). Hypothalamic-autonomic control of energy homeostasis. *Endocrine*, *50*(2), 276-291. <https://doi.org/10.1007/s12020-015-0658-y>
- Seoane-Collazo, P., & López, M. (2018). Analyzing AMPK Function in the Hypothalamus BT - AMPK: Methods and Protocols. In D. Neumann & B. Viollet (Eds.) (pp. 433-448). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7598-3_27
- Seoane-Collazo, P., Martinez de Morentin, P. B., Ferno, J., Dieguez, C., Nogueiras, R., & Lopez, M. (2014). Nicotine improves obesity and hepatic steatosis and ER stress in diet-induced obese male rats. *Endocrinology*, *155*(5), 1679-1689. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1839>
- Seoane-Collazo, P., Roa, J., Rial-Pensado, E., Liñares-Pose, L., Beiroa, D., Ruíz-Pino, F., ... López, M. (2018). SF1-Specific AMPK α 1 Deletion Protects Against Diet-Induced Obesity. *Diabetes*, *67*(11), 2213 LP-2226. <https://doi.org/10.2337/db17-1538>
- Shapiro, K. J. (2004). Animal model research: the apples and oranges quandary. *Alternatives to Laboratory Animals : ATLA*, *32 Suppl 1*, 405-409.
- Sherwin, C. M. (1998). Voluntary wheel running: a review and novel interpretation. *Animal Behaviour*, *56*(1), 11-27. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/anbe.1998.0836>
- Shi, Y.-C., Lau, J., Lin, Z., Zhang, H., Zhai, L., Sperk, G., ... Lin, S. (2013). Arcuate NPY controls sympathetic output and BAT function via a relay of tyrosine hydroxylase neurons in the PVN. *Cell Metabolism*, *17*(2), 236-248. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.01.006>
- Shiele, B. C., & Brozek, J. (1948). "Experimental neurosis" results from semistarvation in mano. *Psychosomatic Medicine*, *10*, 31-50.
- Shih, M.-F., & Taberner, P. V. (1995). Selective activation of brown adipocyte hormone-sensitive lipase and cAMP production in the mouse by β 3-adrenoceptor agonists. *Biochemical Pharmacology*, *50*(5), 601-608. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)00185-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)00185-3)

- Shimizu, N., Oomura, Y., & Kai, Y. (1989). Stress-induced anorexia in rats mediated by serotonergic mechanisms in the hypothalamus. *Physiology & Behavior*, *46*(5), 835–841. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9384\(89\)90045-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9384(89)90045-0)
- Shimogawa, Y., Sakuma, Y., & Yamanouchi, K. (2015). Efferent and afferent connections of the ventromedial hypothalamic nucleus determined by neural tracer analysis: implications for lordosis regulation in female rats. *Neuroscience Research*, *91*, 19–33. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2014.10.016>
- Shin, H., Ma, Y., Chanturiya, T., Cao, Q., Wang, Y., Kadegowda, A. K. G., ... Yu, L. (2017). Lipolysis in Brown Adipocytes Is Not Essential for Cold-Induced Thermogenesis in Mice. *Cell Metabolism*, *26*(5), 764–777.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.09.002>
- Shintani, M., Ogawa, Y., Ebihara, K., Aizawa-Abe, M., Miyanaga, F., Takaya, K., ... Nakao, K. (2001). Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes*, *50*(2), 227–232.
- Siegel, P. S., & Steinberg, M. (1949). Activity level as a function of hunger. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. US: American Psychological Association. <https://doi.org/10.1037/h0059385>
- Siegfried, Z., Berry, E. M., Hao, S., & Avraham, Y. (2003). Animal models in the investigation of anorexia. *Physiology & Behavior*, *79*(1), 39–45. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(03\)00103-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9384(03)00103-3)
- Sienkiewicz, E., Magkos, F., Aronis, K. N., Brinkoetter, M., Chamberland, J. P., Chou, S., ... Mantzoros, C. S. (2011). Long-term metreleptin treatment increases bone mineral density and content at the lumbar spine of lean hypoleptinemic women. *Metabolism*, *60*(9), 1211–1221. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.metabol.2011.05.016>
- Silva, J. E. (2006). Thermogenic Mechanisms and Their Hormonal Regulation. *Physiological Reviews*, *86*(2), 435–464. <https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2005>
- Simpson, K. A., Martin, N. M., & Bloom, S. R. (2009). Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, *53*(2), 120–128.
- Singhal, V., Misra, M., & Klibanski, A. (2014). Endocrinology of anorexia nervosa in young people: recent insights. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*, *21*(1), 64–70. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000026>
- Sirotkin, A. V., Chrenkova, M., Nitrayová, S., Patraš, P., Darlak, K., Valenzuela, F., ... & Tena-Sempere, M. (2008). Effects of chronic food restriction and treatments with leptin or ghrelin on different reproductive parameters of male rats. *Peptides*, *29*(8), 1362–1368. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.03.011>
- Sivitz, W. I., Walsh, S. A., Morgan, D. A., Thomas, M. J., & Haynes, W. G. (1997). Effects of leptin on insulin sensitivity in normal rats. *Endocrinology*, *138*(8), 3395–3401. <https://doi.org/10.1210/endo.138.8.5327>
- Skrede, S., Martins, L., Berge, R. K., Steen, V. M., Lopez, M., & Ferno, J. (2014). Olanzapine depot formulation in rat: a step forward in modelling antipsychotic-induced metabolic

- adverse effects. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 17(1), 91–104. <https://doi.org/10.1017/S1461145713000862>
- Small, C. J., Liu, Y. L., Stanley, S. A., Connoley, I. P., Kennedy, A., Stock, M. J., & Bloom, S. R. (2003). Chronic CNS administration of Agouti-related protein (Agrp) reduces energy expenditure. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders : Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 27(4), 530–533. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802253>
- Smink, F. R. E., van Hoeken, D., & Hoek, H. W. (2012). Epidemiology of Eating Disorders: Incidence, Prevalence and Mortality Rates. *Current Psychiatry Reports*, 14(4), 406–414. <https://doi.org/10.1007/s11920-012-0282-y>
- Smith, A. T., & Wolfe, B. E. (2008). Amenorrhea as a diagnostic criterion for anorexia nervosa: a review of the evidence and implications for practice. *Journal of the American Psychiatric Nurses Association*, 14(3), 209–215. <https://doi.org/10.1177/1078390308320288>
- Smith, G. P. (1989). Animal Models of Human Eating Disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 575(1), 63–74. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1989.tb53233.x>
- Södersten, P., Bergh, C., Leon, M., & Zandian, M. (2016). Dopamine and anorexia nervosa. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 60, 26–30. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.11.003>
- Sohn, J.-W., Elmquist, J. K., & Williams, K. W. (2013). Neuronal circuits that regulate feeding behavior and metabolism. *Trends in Neurosciences*, 36(9), 504–512. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.05.003>
- Sours, J. (1974). The Anorexia nervosa syndrome. *International Journal of Psycho-Analysis*, 55, 567–576.
- Speakman, J. R., & Keijer, J. (2013). Not so hot: Optimal housing temperatures for mice to mimic the thermal environment of humans. *Molecular Metabolism*, 2(1), 5–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molmet.2012.10.002>
- Spear, N. E., & Hill, W. F. (1962). Methodological note: Excessive weight loss in rats living in activity wheels. *Psychological Reports*, 11(2), 437–438. <https://doi.org/10.2466/pr0.1962.11.2.437>
- Spencer, L., Schmidt-Hantke, J., Allen, K., Gordon, G., Potterton, R., Musiat, P., ... Schmidt, U. (2018). A web-based intervention for carers of individuals with anorexia nervosa (We Can): Trial protocol of a randomised controlled trial investigating the effectiveness of different levels of support. *Internet Interventions*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.invent.2018.02.005>
- Spiegelman, B. M., & Flier, J. S. (2001). Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*, 104(4), 531–543.
- Spielberger, C. D., Gorsuch, R. L., & Lushene, R. E. (1970). Manual for the State-Trait Anxiety Inventory (Self-evaluation questionnaire). In *Palo Alto, CA : Consulting Psychologists Press*.
- Stanley, B. G., Kyrkouli, S. E., Lampert, S., & Leibowitz, S. F. (1986). Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of

- hyperphagia and obesity. *Peptides*, 7(6), 1189–1192.
- Stanley, S., Wynne, K., McGowan, B., & Bloom, S. (2005). Hormonal Regulation of Food Intake. *Physiological Reviews*, 85(4), 1131–1158. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2004>
- Steinberg, G. R., Michell, B. J., van Denderen, B. J. W., Watt, M. J., Carey, A. L., Fam, B. C., ... Kemp, B. E. (2006). Tumor necrosis factor alpha-induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. *Cell Metabolism*, 4(6), 465–474. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.11.005>
- Steinhausen, H.-C. (2002). The Outcome of Anorexia Nervosa in the 20th Century. *American Journal of Psychiatry*, 159(8), 1284–1293. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.159.8.1284>
- Stengel, A., Haas, V., Elbelt, U., Correll, C. U., Rose, M., & Hofmann, T. (2017). Leptin and Physical Activity in Adult Patients with Anorexia Nervosa: Failure to Demonstrate a Simple Linear Association. *Nutrients*, 9(11), 1210. <https://doi.org/10.3390/nu9111210>
- Stevenson, J. A., & Rixon, R. (1957). Environmental temperature and deprivation of food and water on the spontaneous activity of rats. *Yale Journal of Biological Medicine*, 29, 575–584.
- Sutton, A. K., Pei, H., Burnett, K. H., Myers, M. G. J., Rhodes, C. J., & Olson, D. P. (2014). Control of food intake and energy expenditure by Nos1 neurons of the paraventricular hypothalamus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(46), 15306–15318. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0226-14.2014>
- Tanida, M., Yamamoto, N., Shibamoto, T., & Rahmouni, K. (2013). Involvement of hypothalamic AMP-activated protein kinase in leptin-induced sympathetic nerve activation. *PloS One*, 8(2), e56660. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056660>
- Tartaglia, L. A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., ... Tepper, R. I. (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*, 83(7), 1263–1271.
- Thim, L., Kristensen, P., Larsen, P. J., & Wulff, B. S. (1998). CART, a new anorectic peptide. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 30(12), 1281–1284.
- Thompson, M. P., Cooper, S. T., Parry, B. R., & Tuckey, J. A. (1993). Increased expression of the mRNA for hormone-sensitive lipase in adipose tissue of cancer patients. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1180(3), 236–242.
- Thompson, M. P., Koons, J. E., Tan, E. T., & Grigor, M. R. (1981). Modified lipoprotein lipase activities, rates of lipogenesis, and lipolysis as factors leading to lipid depletion in C57BL mice bearing the preputial gland tumor, ESR-586. *Cancer Research*, 41(8), 3228–3232.
- Toro, J. (1996). El cuerpo como delito: Anorexia, bulimia, cultura y sociedad. In *Barcelona: Ariel*.
- Toro, J. (2004). Riesgo y causas de la anorexia nerviosa. In *Barcelona: Ariel*.
- Touyz, S. W., Beumont, P. J. V., Glaun, D., Phillips, T., & Cowie, I. (1984). A Comparison of Lenient and Strict Operant Conditioning Programmes in Refeeding Patients with Anorexia Nervosa. *British Journal of Psychiatry*, 144(5), 517–520. <https://doi.org/DOI:>

10.1192/bjp.144.5.517

- Treasure, J. (2010). Eating disorders. *Lancet*, 375, 583–593.
- Treasure, J., & Cardi, V. (2017). Anorexia Nervosa, Theory and Treatment: Where Are We 35 Years on from Hilde Bruch's Foundation Lecture? *European Eating Disorders Review*, 25(3), 139–147. <https://doi.org/10.1002/erv.2511>
- Treasure, J., Zipfel, S., Micali, N., Wade, T. D., Stice, E., Claudino, A. M., ... Wentz, E. (2015). Anorexia Nervosa. *Nature Reviews. Disease Primers*, 15074, 1507.
- Treichler, F. R., & Hall, J. F. (1962). The relationship between deprivation weight loss and several measures of activity. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 55, 346–349.
- Tsoli, M., Moore, M., Burg, D., Painter, A., Taylor, R., Lockie, S. H., ... Robertson, G. (2012). Activation of Thermogenesis in Brown Adipose Tissue and Dysregulated Lipid Metabolism Associated with Cancer Cachexia in Mice. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3536>
- Tsuda, A., Tanaka, M., Iimori, K., Ida, Y., & Nagasaki, N. (1981). Effects of divided feeding on activity-stress ulcer and the thymus weight in the rat. *Physiology & Behavior*, 27(2), 349–353. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(81\)90279-1](https://doi.org/10.1016/0031-9384(81)90279-1)
- Tucker, P., & Gilliland, J. (2007). The effect of season and weather on physical activity: A systematic review. *Public Health*, 121(12), 909–922. <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2007.04.009>
- Vaisse, C., Clement, K., Guy-Grand, B., & Froguel, P. (1998, October). A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nature Genetics*. United States. <https://doi.org/10.1038/2407>
- Van Dijk, G. (2001). The Role of Leptin in the Regulation of Energy Balance and Adiposity. *Journal of Neuroendocrinology*, 13(10), 913–921. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2001.00707.x>
- van Elburg, A. A., Kas, M. J. H., Hillebrand, J. J. G., Eijkemans, R. J. C., & van Engeland, H. (2007). The impact of hyperactivity and leptin on recovery from anorexia nervosa. *Journal of Neural Transmission*, 114(9), 1233. <https://doi.org/10.1007/s00702-007-0740-6>
- van Marken Lichtenbelt, W. D., & Schrauwen, P. (2011). Implications of nonshivering thermogenesis for energy balance regulation in humans. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 301(2), R285-96. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00652.2010>
- Vandereycken, W., & Van Deth, R. (1989). Who was the first to describe anorexia nervosa: Gull or Lasègue? *Psychological Medicine*, 19(4), 837–845. <https://doi.org/10.1017/S0033291700005559>
- Vazquez, R., Carrera, O., Birmingham, L., & Gutierrez, E. (2006). Exploring the association between anorexia nervosa and geographical latitude. *Eating and Weight Disorders - Studies on Anorexia, Bulimia and Obesity*, 11(1), e1–e8. <https://doi.org/10.1007/BF03327745>

- Verhagen, L. A. W., Luijendijk, M. C. M., & Adan, R. A. H. (2011). Leptin reduces hyperactivity in an animal model for anorexia nervosa via the ventral tegmental area. *European Neuropsychopharmacology*, 21(3), 274–281. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2010.11.006>
- Villanueva, E. C., & Myers Jr, M. G. (2009). Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *International Journal Of Obesity*, 32, S8. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.232>
- Virtanen, K. A., Lidell, M. E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., ... Nuutila, P. (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *The New England Journal of Medicine*, 360(15), 1518–1525. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808949>
- von Ballmoos, C., Wiedenmann, A., & Dimroth, P. (2009). Essentials for ATP synthesis by F1F0 ATP synthases. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 649–672. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.104803>
- Wakeling, A., & Russell, G. F. M. (1970). Disturbances in the regulation of body temperature in anorexia nervosa. *Psychological Medicine*, 1(1), 30–39. <https://doi.org/DOI:10.1017/S0033291700039994>
- Waller, J., Kaufman, R. y Deutsch, F. (1940). Anorexia nervosa, a psychosomatic entity. En R. Kaufman (Ed.), *Evolution of psychosomatic concepts. Anorexia Nervosa: A paradigm* (1965), (pp.245-273). London. The Hogart Press.
- Walsh, B. T. (2007). DSM-V from the perspective of the DSM-IV experience. *International Journal of Eating Disorders*, 40(S3), S3–S7. <https://doi.org/10.1002/eat.20397>
- Walters, E. E., & Kendler, K. S. (1995). Anorexia nervosa and anorexic-like syndromes in a population-based female twin sample. *The American Journal of Psychiatry*, 152(1), 64–71. <https://doi.org/10.1176/ajp.152.1.64>
- Wang, T., Hartzell, D. L., Rose, B. S., Flatt, W. P., Hulsey, M. G., Menon, N. K., ... & Baile, C. A. (1998). Metabolic responses to intracerebroventricular leptin and restricted feeding. *Physiology & behavior*, 65(4-5), 839-848. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00243-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00243-1)
- Wang, J., & Leibowitz, K. L. (1997). Central insulin inhibits hypothalamic galanin and neuropeptide Y gene expression and peptide release in intact rats. *Brain Research*, 777(1–2), 231–236.
- Warren, M. P., & Vande Wiele, R. L. (1973). Clinical and metabolic features of anorexia nervosa. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 117(3), 435–449. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0002-9378\(73\)90053-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0002-9378(73)90053-7)
- Watanabe, K., Hara, C., & Ogawa, N. (1990). Relationship between running activity rhythm and the development of activity-stress ulcer in rats. *Japanese Journal of Pharmacology*, 52(3), 421–429.
- Watanabe, K., Hara, C., & Ogawa, N. (1992). Feeding conditions and estrous cycle of female rats under the activity-stress procedure from aspects of anorexia nervosa. *Physiology & Behavior*, 51(4), 827–832. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9384\(92\)90122-I](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9384(92)90122-I)
- Watson, T. L., & Andersen, A. E. (2003). A critical examination of the amenorrhea and weight

- criteria for diagnosing anorexia nervosa. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 108(3), 175–182.
- Weber, P. (1939). Discussion on anorexia nervosa. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 36, 746.
- Welt, C. K., Chan, J. L., Bullen, J., Murphy, R., Smith, P., DePaoli, A. M., ... Mantzoros, C. S. (2004). Recombinant Human Leptin in Women with Hypothalamic Amenorrhea. *New England Journal of Medicine*, 351(10), 987–997. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040388>
- Wen, S., Wang, C., Gong, M., & Zhou, L. (2018). An overview of energy and metabolic regulation. *Science China Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s11427-018-9371-4>
- Werme, M., Messer, C., Olson, L., Gilden, L., Thorén, P., Nestler, E. J., & Brené, S. (2002). Δ FosB regulates wheel running. *Journal of Neuroscience*, 22(18), 8133–8138. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-18-08133.2002>
- Westmoreland, P., Krantz, M. J., & Mehler, P. S. (2016). Medical Complications of Anorexia Nervosa and Bulimia. *The American Journal of Medicine*, 129(1), 30–37. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2015.06.031>
- White, B. D., Martin, R. J., Burden, V. R., & Dean, R. G. (1993). Activity of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis is Elevated in Rats with Activity-Based Anorexia. *The Journal of Nutrition*, 123(7), 1217–1225. <https://doi.org/10.1093/jn/123.7.1217>
- Whittle, A. J., Carobbio, S., Martins, L., Slawik, M., Hondares, E., Vazquez, M. J., ... Vidal-Puig, A. (2012). BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell*, 149(4), 871–885. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.066>
- Whytt, R. (1765). *Observations on the nature, causes, and cure of those disorders which have been commonly called nervous, hypochondriac, or hysteric: to which are prefixed some remarks on the sympathy of the nerves*. T. Becket, and P. Du Hondt, London, and J. Balfour, Edinburgh.
- Williams, L. M. (2012). Hypothalamic dysfunction in obesity. *Proceedings of the Nutrition Society*, 71(4), 521–533. <https://doi.org/DOI: 10.1017/S002966511200078X>
- Wise, R. A. (2004). Dopamine, learning and motivation. *Nature Reviews Neuroscience*, 5, 483. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nrn1406>
- Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S.-P., Momcilovic, M., Johnstone, S. R., ... Carling, D. (2005). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metabolism*, 2(1), 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.06.005>
- Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G. D., Neumann, D., ... Carling, D. (2003). LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Current Biology : CB*, 13(22), 2004–2008.
- Woodside, D. B. y Twose, R. (2004). Diagnostic issues in eating disorders: historical perspectives and thoughts for the future. (pp. 1-19). En T.D. Brewerton (ed.) *Clinical Handbook of eating disorders: An integrated approach*. New York: Marcel Dekker, Inc.

- Wu, M. V., Bikopoulos, G., Hung, S., & Ceddia, R. B. (2014). Thermogenic capacity is antagonistically regulated in classical brown and white subcutaneous fat depots by high fat diet and endurance training in rats impact on whole-body energy expenditure. *Journal of Biological Chemistry*, 289(49), 34129-34140.
- Wu, J., Bostrom, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A.-H., ... Spiegelman, B. M. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, 150(2), 366–376. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.016>
- Xie, M., Zhang, D., Dyck, J. R. B., Li, Y., Zhang, H., Morishima, M., ... Schneider, M. D. (2006). A pivotal role for endogenous TGF-beta-activated kinase-1 in the LKB1/AMP-activated protein kinase energy-sensor pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(46), 17378–17383. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604708103>
- Xu, B., Goulding, E. H., Zang, K., Cepoi, D., Cone, R. D., Jones, K. R., ... Reichardt, L. F. (2003). Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nature Neuroscience*, 6(7), 736–742. <https://doi.org/10.1038/nn1073>
- Yager, J., Devlin, M. J., Halmi, K. A., Herzog, D. B., Mitchell III, J. E., Powers, P., & Zerbe, K. J. (2014). Guideline watch (August 2012): practice guideline for the treatment of patients with eating disorders. *Focus*, 12(4), 416-431.
- Yaspelkis III, B. B., Ansari, L., Ramey, E. L., Holland, G. J., & Loy, S. F. (1999). Chronic leptin administration increases insulin-stimulated skeletal muscle glucose uptake and transport. *Metabolism*, 48(5), 671-676. [https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(99\)90070-7](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(99)90070-7)
- Yellowless, H. (1939). Discussion on anorexia nervosa. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 36, 746.
- Young, J. B., Saville, E., Rothwell, N. J., Stock, M. J., & Landsberg, L. (1982). Effect of diet and cold exposure on norepinephrine turnover in brown adipose tissue of the rat. *The Journal of Clinical Investigation*, 69(5), 1061–1071.
- Yuan, L., Han, J., Meng, Q., Xi, Q., Zhuang, Q., Jiang, Y., ... Wu, G. (2015). Muscle-specific E3 ubiquitin ligases are involved in muscle atrophy of cancer cachexia: an in vitro and in vivo study. *Oncology Reports*, 33(5), 2261–2268. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3845>
- Zabala, M. J., Macdonald, P., & Treasure, J. (2009). Appraisal of caregiving burden, expressed emotion and psychological distress in families of people with eating disorders: A systematic review. *European Eating Disorders Review*, 17(5), 338–349. <https://doi.org/10.1002/erv.925>
- Zandian, M., Holmstedt, E., Larsson, A., Bergh, C., Brodin, U., & Södersten, P. (2017). Anxiolytic effect of warmth in anorexia nervosa. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 135(3), 266–267. <https://doi.org/10.1111/acps.12691>
- Zeeck, A., Herpertz-Dahlmann, B., Friederich, H.-C., Brockmeyer, T., Resmark, G., Hagenah, U., ... Hartmann, A. (2018). Psychotherapeutic Treatment for Anorexia Nervosa: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Frontiers in Psychiatry*, 9, 158. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00158>

- Zhan, C., Zhou, J., Feng, Q., Zhang, J.-E., Lin, S., Bao, J., ... Luo, M. (2013). Acute and long-term suppression of feeding behavior by POMC neurons in the brainstem and hypothalamus, respectively. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(8), 3624–3632. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2742-12.2013>
- Zhang, L.-N., Mitchell, S. E., Hambly, C., Morgan, D. G., Clapham, J. C., & Speakman, J. R. (2012). Physiological and behavioral responses to intermittent starvation in C57BL/6J mice. *Physiology & Behavior*, 105(2), 376–387. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.08.035>
- Zhang, N., & Bi, S. (2018). Effects of physical exercise on food intake and body weight: Role of dorsomedial hypothalamic signaling. *Physiology & Behavior*, 192, 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.03.018>
- Zhang, R., Dhillon, H., Yin, H., Yoshimura, A., Lowell, B. B., Maratos-Flier, E., & Flier, J. S. (2008). Selective inactivation of Socs3 in SF1 neurons improves glucose homeostasis without affecting body weight. *Endocrinology*, 149(11), 5654–5661. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0805>
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(6505), 425–432. <https://doi.org/10.1038/372425a0>
- Zingaretti, M. C., Crosta, F., Vitali, A., Guerrieri, M., Frontini, A., Cannon, B., ... Cinti, S. (2009). The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(9), 3113–3120. <https://doi.org/10.1096/fj.09-133546>
- Zipfel, S., Giel, K. E., Bulik, C. M., Hay, P., & Schmidt, U. (2015). Anorexia nervosa: aetiology, assessment, and treatment. *The Lancet Psychiatry*, 2(12), 1099–1111. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(15\)00356-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2215-0366(15)00356-9)
- Zipfel, S., Löwe, B., Reas, D. L., Deter, H.-C., & Herzog, W. (2000). Long-term prognosis in anorexia nervosa: lessons from a 21-year follow-up study. *The Lancet*, 355(9205), 721–722. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)05363-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)05363-5)
- Zipfel, S., Wild, B., Groß, G., Friederich, H.-C., Teufel, M., Schellberg, D., ... Herzog, W. (2014). Focal psychodynamic therapy, cognitive behaviour therapy, and optimised treatment as usual in outpatients with anorexia nervosa (ANTOP study): randomised controlled trial. *The Lancet*, 383(9912), 127–137. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61746-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61746-8)

ANEXO 1

Listado de licencias para las tablas y figuras:

Tabla/Figura	Referencia	Editorial	Nº de licencia
Tabla 2	Zipfel et al, 2015	Elsevier	4521930433441
Tabla 2 (Continuación)	Zipfel et al, 2015	Elsevier	4521930433441
Figura 36	Saper & Lowell, 2014	Elsevier	4558811314096
Figura 37	Nedergaard & Cannon, 2018	Elsevier	4542720697201





ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Criterios diagnósticos de la anorexia nerviosa en las versiones DSM-IV-TR y DSM-V.28

Tabla 2. Principales tratamientos psicosociales recomendados para el tratamiento de la anorexia nerviosa..... 36

Tabla 2 (Continuación). Principales tratamientos psicosociales recomendados para el tratamiento de la anorexia nerviosa. 37

Tabla 3. Composición del tampón de lisis..... 74

Tabla 4. Composición del tampón de carga 5X..... 75

Tabla 5. Composición de los geles separadores de acrilamida en función de su porcentaje.... 76

Tabla 6. Composición del gel concentrador 4%..... 76

Tabla 7. Composición del tampón de running 5X..... 76

Tabla 8. Composición del tampón de transferencia 25X y 1X..... 77

Tabla 9. Composición del tampón de lavado 10X y 1X..... 77

Tabla 10. Relación de anticuerpos usados y su dilución 78

Tabla 11. Componentes de la reacción de Retrotranscripción (RT)..... 80

Tabla 12. Componentes y proporciones de la reacción de PCR en tiempo real..... 81

Tabla 13. Primers y sondas para Real Time PCR. 82

Tabla 14. Porcentaje de la ratio de actividad diaria durante la fase de luz/actividad diaria total – L/(L+O)- durante la fase de restricción (RA)..... 100

Tabla 15. Media y SEM de la ingesta diaria (g/día) de todos los grupos experimentales durante la fase ad libitum completa (Día -14 a Día -1) y durante la última semana de la fase ad libitum (Día -7 a Día -1)..... 118

Tabla 16. Porcentaje de la ratio de actividad diaria durante la fase de oscuridad/actividad diaria total – O/(L+O)- durante la fase ad libitum (AL) y la fase de restricción (RA)..... 121

Tabla 17. Porcentaje de la ratio de actividad diaria durante la fase de luz/actividad diaria total – L/(L+O)- durante la fase de restricción (RA)..... 123

Tabla 18. Valores de F y p para el efecto principal de los ANOVA de medidas repetidas y valor de t y p de la prueba t de Student para los Estudios 1 y 3. 126

Tabla 19. Valores de F y p para el efecto principal de los ANOVA de medidas repetidas y valor de t y p de la prueba t de Student, durante la fase ad libitum (AL). 126

Tabla 20. Media de actividad en el último día de la fase pretratamiento (Día -1) y en el último día de la fase de tratamiento (Día 6) para las ratas tratadas con vehículo (VH) y las tratadas con leptina (LEP). 129

Tabla 21. Porcentaje de la ratio de actividad diaria durante la fase de luz/actividad diaria total – L/(L+O)- durante la fase de tratamiento..... 131

Tabla 22. Valores de F, grados de libertad y significación para el efecto principal de los ANOVA de medidas repetidas y del ANOVA de una vía durante la fase pretratamiento de ratas sometidas al procedimiento ad libitum.	134
Tabla 23. Media de actividad en el último día de la fase pretratamiento (Día -1) y en el último día de la fase de tratamiento (Día 6) para las ratas tratadas con vehículo (VH) y las tratadas con leptina (LEP1.29 y LEP2.00).	136
Tabla 24. Porcentaje de la ratio de actividad diaria durante la fase de luz/actividad diaria total – L/(L+O)- durante la fase de restricción (RA) para los grupos experimentales del Estudio 1: vehículo, dosis estándar y dosis 2 mg/ml ⁻¹	140
Tabla 25. Porcentaje de la ratio de actividad diaria durante la fase de luz/actividad diaria total – L/(L+O)- durante la fase de tratamiento para los grupos experimentales del Estudio 3: vehículo, dosis estándar y dosis 2 mg/ml ⁻¹	142
Tabla 26. Valores de F y p para el efecto principal de los ANOVA de medidas repetidas y valor de F y p del ANOVA de una vía realizados para los Estudios 1, 3 y 4.	143
Tabla 27. Valores de F y p para el efecto principal de los ANOVA de medidas repetidas y valor de F y p del ANOVA de una vía realizados para la fase AL.	146
Tabla 28. Porcentaje de la ratio de actividad diaria durante la fase de luz/actividad diaria total – L/(L+O)- durante la fase de restricción (RA).	147
Tabla 29. Valores de F, grados de libertad y significación para los Factores de Interacción y para los efectos principales del ANOVA de medidas repetidas realizados para la variable de temperatura corporal.	170
Tabla 30. Parámetros metabólicos séricos. <i>n</i> = 9-11 animales por grupo experimental.	181
Figura 1. Alternativa del modelo análogo ABA del comportamiento hiperactivo en la anorexia nerviosa.	44
Figura 2. Paralelismo en las manifestaciones presentes en los animales sometidos a ABA y las pacientes con AN. Modificada a partir de Cerrato, 2010.	47
Figura 3. Detalle del procedimiento, de fases, condiciones y número de animales utilizados en el estudio de prevención de la hiperactividad en SIH.	93
Figura 4. Actividad diaria en la rueda (A), peso corporal (B) y temperatura corporal (C) durante la fase ad libitum (Día -28 a Día -1) y durante la fase de restricción de alimento (Día 0 a Día 6). La línea vertical punteada separa las dos fases del experimento. Todos los datos se expresan como media ± SEM.	95
Figura 5. Ganancia de peso corporal acumulada durante la primera fase ad libitum (AL) y durante la fase de restricción de alimento (RA) para los diferentes grupos experimentales. Los datos se expresan como media ± SEM.	96
Figura 6. Actividad media diaria y temperatura corporal durante la fase de luz y durante la fase de oscuridad en la fase ad libitum (AL). Todos los datos se expresan como media ± SEM. ...	98

Figura 7. Actividad media diaria y temperatura corporal durante la fase de luz (panel superior) y durante la fase de oscuridad (panel inferior) en la fase de restricción de alimento (RA). Todos los datos se expresan como media \pm SEM. 99

Figura 8. Niveles de mRNA de POMC, CART, AgRP, NPY y MC4R en el núcleo arcuato del hipotálamo. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. 101

Figura 9. Imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (A) y niveles de UCP1 en el BAT (B). Los datos se expresan como media \pm SEM. 102

Figura 10. Detalle del procedimiento, de fases, condiciones y número de animales utilizados en el procedimiento de restricción de alimento. 113

Figura 11. Detalle del procedimiento, de fases, condiciones y número de animales utilizados en el procedimiento de alimentación ad libitum. 114

Figura 12. Actividad diaria en la rueda (A), peso corporal (B) y temperatura corporal (C) durante la fase ad libitum (Día -14 a Día -1) y durante la fase de restricción de alimento (Día 0 a Día 6). La línea vertical punteada separa las dos fases del experimento. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. 117

Figura 13. Ganancia de peso corporal acumulada durante la primera fase ad libitum (AL) y durante la fase de restricción de alimento (RA) (A). Ingesta durante la primera fase ad libitum (AL) (B). Los grupos representados son los tres grupos del Estudio 1 (21VH, 21LEP y 32VH) y los dos grupos del Estudio 2 (25VH, 25LEP). Todos los datos se expresan como media \pm SEM. 118

Figura 14. Actividad media diaria y temperatura corporal durante la fase de luz y la fase de oscuridad para los grupos experimentales mantenidos a 21°C (panel superior) y para los grupos experimentales mantenidos a 25°C (panel inferior) en la fase ad libitum (AL). Todos los datos se expresan como media \pm SEM. 120

Figura 15. Actividad media diaria y temperatura corporal durante la fase de luz (A) y durante la fase de oscuridad (B) en la fase de restricción de alimento (RA). Todos los datos se expresan como media \pm SEM. 122

Figura 16. Niveles circulantes de leptina en sangre (ng/ml). Todos los datos se expresan como media \pm SEM. 124

Figura 17. Ingesta durante los primeros 90 minutos después de recibir la ración de comida en la fase RA. Los grupos representados son: 21VH, 21LEP, 32VH, 25VH y 25LEP. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. 125

Figura 18. Actividad diaria en la rueda, peso corporal, temperatura corporal, ingesta y ganancia de peso corporal durante la fase AL (Día -14 a Día -1) para los Estudios 1 y 3. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. 127

Figura 19. Actividad diaria en la rueda (A), peso corporal (B) y temperatura corporal (C) durante la fase pretratamiento (Día -14 a Día -1) y durante la fase de tratamiento (Día 0 a Día 6). La línea vertical punteada separa las dos fases del experimento. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. 128

Figura 20. Ingesta (A) y ganancia de peso acumulada (B) durante la fase pretratamiento (Día -14 a Día -1) y durante la fase de tratamiento (Día 0 a Día 6). La línea vertical punteada separa las dos fases del experimento. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. 129

Figura 21. Actividad media diaria y temperatura corporal durante la fase de luz y durante la fase de oscuridad en la fase ad libitum (AL). Todos los datos se expresan como media \pm SEM. 130

Figura 22. Actividad media diaria y temperatura corporal durante la fase de luz (panel superior) y durante la fase de oscuridad (panel inferior) en la fase de tratamiento de las ratas ad libitum. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. 131

Figura 23. Niveles de proteína de UCP1 para los grupos con restricción de alimento 21VH, 21LEP y 32VH (panel inferior) e imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (panel superior) (A). Niveles de proteína de UCP1 para los grupos con restricción de alimento 25VH y 25LEP (panel inferior) e imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (panel superior) (B). Niveles de proteína de UCP1 para los grupos con alimentación ad libitum VH y LEP (panel inferior) e imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (panel superior). Todos los datos se expresan como media \pm SEM. 132

Figura 24. Actividad diaria en la rueda (A), peso corporal (B) y temperatura corporal (C) durante la fase ad libitum (Día -14 a Día -1) y durante la fase de restricción de alimento (Día 0 a Día 6). La línea vertical punteada separa las dos fases del experimento. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. 135

Figura 25. Ganancia de peso corporal acumulada durante la primera fase ad libitum (AL) y durante la fase de restricción de alimento (RA) pertenecientes al Estudio 1. Los datos se expresan como media \pm SEM. 136

Figura 26. Actividad diaria en la rueda (A), peso corporal (B) y temperatura corporal (C) durante la fase pretratamiento (Día -14 a Día -1) y durante la fase de tratamiento (Día 0 a Día 6). La línea vertical punteada separa las dos fases del experimento. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. 137

Figura 27. Ingesta (A) y ganancia de peso acumulada (B) durante la fase pretratamiento (Día -14 a Día -1) y durante la fase de tratamiento (Día 0 a Día 6). La línea vertical punteada separa las dos fases del experimento. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. 138

Figura 28. Actividad media diaria y temperatura corporal durante la fase de luz y la fase de oscuridad para el Estudios 1 (panel superior) y el Estudio 3 (panel inferior) en la primera fase de cada procedimiento en el que los animales tienen acceso a rueda de actividad y comida las 24 h. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. 139

Figura 29. Actividad media diaria y temperatura corporal durante la fase de luz (panel superior) y durante la fase de oscuridad (panel inferior) en la fase de restricción de alimento (RA) para los grupos del Estudio 1: vehículo, dosis estándar y dosis 2 mg/ml⁻¹. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. 140

Figura 30. Actividad media diaria y temperatura corporal durante la fase de luz (panel superior) y durante la fase de oscuridad (panel inferior) en la fase de restricción de alimento (RA) para

los grupos del Estudio 3: vehículo, dosis estándar y dosis 2 mg/ml⁻¹. Todos los datos se expresan como media ± SEM. 141

Figura 31. Actividad diaria en la rueda, peso corporal, temperatura corporal, ingesta y ganancia de peso corporal durante la fase AL (Día -14 a Día 1) para los Estudios 1, 3 y 4. Todos los datos se expresan como media ± SEM..... 144

Figura 32. Actividad diaria en la rueda (A), peso corporal (B) y temperatura corporal (C) durante la fase ad libitum (Día -14 a Día -1) y durante la fase de restricción (Día 0 a Día 6). La línea vertical punteada separa las dos fases del experimento. Todos los datos se expresan como media ± SEM..... 145

Figura 33. Ganancia de peso acumulada durante la fase ad libitum (Día -14 a Día -1) y durante la fase de restricción (Día 0 a Día 6). Todos los datos se expresan como media ± SEM 146

Figura 34. Actividad media diaria y temperatura corporal durante la fase de luz y la fase de oscuridad para los grupos experimentales del Estudio 4, vehículo vs leptina de ratón, en la fase ad libitum (AL). Todos los datos se expresan como media ± SEM 147

Figura 35. Actividad media diaria y temperatura corporal durante la fase de luz (panel superior) y durante la fase de oscuridad (panel inferior) en la fase de restricción de alimento (RA) para los grupos del Estudio 4, vehículo vs leptina de ratón. Todos los datos se expresan como media ± SEM..... 148

Figura 36. Esquema de los principales núcleos hipotalámicos implicados en el balance energético (marcados con líneas en negro). Extraído de Saper & Lowell, 2014. Con permiso de Elsevier. 158

Figura 37. Visión general del mecanismo de producción de calor en el tejido adiposo pardo (BAT). Extraído de Nedergaard & Cannon, 2018. Con permiso de Elsevier. 163

Figura 38. Visión general de la regulación del metabolismo lipídico por AMPK. Extraído de Lipovka & Konhilas, 2015. Licencia Creative Commons. 165

Figura 39. Detalle del procedimiento, de fases y número de animales utilizados. El color de las cajas representa la temperatura ambiente a la que fueron alojados los animales: azul = 21°C y rojo = 32°C. A la derecha de la imagen aparece representada la composición de la muestra para el Estudio 1 y el Estudio 2..... 167

Figura 40. Actividad diaria en la rueda (A) y peso corporal relativo al peso en el Día 0 (B) durante los días previos y posteriores a alcanzar el CPP20%, y el Día Final. La línea vertical punteada indica el momento en el que se elevó la temperatura ambiente a 32°C para los grupos AC32 e IN32. Todos los datos se expresan como media ± SEM..... 169

Figura 41. Temperatura corporal (A) e ingesta diaria (B) durante los días previos y posteriores a alcanzar el CPP20%, y el Día Final. La línea vertical punteada indica el momento en el que se elevó la temperatura ambiente a 32°C para los grupos AC32 e IN32. Sólo se muestran seis puntos en el eje de abscisas para la ingesta ya que el experimento se terminó después de haber registrado el peso y antes de registrar la ingesta. Todos los datos se expresan como media ± SEM..... 170

Figura 42. Cuantificación de los niveles de mRNA de marcadores termogénicos (A), niveles de proteína de UCP1 (panel izquierdo) e imágenes autorradiográficas representativas (panel

derecho) (B), en el BAT. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-11$ animales por grupo experimental.	172
Figura 43. Niveles de proteína de la ruta de AMPK en el hipotálamo entero. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-8$ animales por grupo experimental.	173
Figura 44. Niveles proteicos de la vía de AMPK en el núcleo ventromedial (panel izquierdo) e imágenes autorradiográficas representativas (panel derecho) (A), y niveles de proteína de la ruta de AMPK en el núcleo arcuato (panel izquierdo) e imágenes autorradiográficas representativas (panel derecho) (B). Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-8$ animales por grupo experimental.	174
Figura 45. Niveles proteicos de la vía de AMPK en el hígado (panel izquierdo) e imágenes autorradiográficas representativas (panel derecho) (A). Niveles de triglicéridos y colesterol hepáticos (B). Secciones de hígado teñidas con Oil-Red representativas (barra de escala: 100 μ m) (C). Niveles circulantes de triglicéridos y colesterol (D). Niveles de glucógeno hepático (E). Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-11$ animales por grupo experimental	176
Figura 46. Cuantificación de los niveles de mRNA de marcadores de adipogénesis y lipogénesis en el tejido adiposo blanco (WAT). Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-11$ animales por grupo experimental.	178
Figura 47. Niveles de mRNA de PGC1 α , PRDM16 y CIDEA (A). Niveles proteicos de UCP1 (B). Área teñida de la inmunohistoquímica con UCP1 (panel izquierdo) e imágenes representativas (panel derecho) (C). Área del adipocito (panel izquierdo) e imágenes representativas de hematoxilina-eosina (D). Barra de escala: 100 μ m. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-11$ animales por grupo experimental	179
Figura 48. Niveles de mRNA de marcadores de caquexia en el músculo. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-11$ animales por grupo experimental. Abreviaturas: * AC21 vs AC32 o IN21 vs IN32; #AC21 vs IN21.....	180
Figura 49. Niveles proteicos de la vía UPR en el núcleo ventromedial (A), y niveles de proteínas de marcadores de inflamación en el núcleo ventromedial. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-8$ animales por grupo experimental.	182
Figura 50. Niveles proteicos de la vía de mTOR en el núcleo arcuato (panel superior) e imágenes autorradiográficas representativas (panel inferior). Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-8$ animales por grupo experimental	183
Figura 51. Actividad diaria en la rueda (A) y peso corporal relativo al peso en el Día 0 (B) durante los días previos y posteriores a alcanzar el CPP20%, y el Día Final para el Estudio 2. La línea vertical punteada indica el momento en el que se elevó la temperatura ambiente a 32°C para los grupos AC32 e IN32. Todos los datos se expresan como media \pm SEM.....	185
Figura 52. Temperatura corporal (A) e ingesta diaria (B) durante los días previos y posteriores a alcanzar el CPP20%, y el Día Final para el Estudio 2. La línea vertical punteada indica el momento en el que se elevó la temperatura ambiente a 32°C para los grupos AC32 e IN32. Sólo se muestran seis puntos en el eje de abscisas para la ingesta ya que el experimento se terminó	

después de haber registrado el peso y antes de registrar la ingesta. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. 186

Figura 53. Imágenes térmicas representativas (panel izquierdo) y temperatura de la piel del área del BAT (A), niveles de UCP1 y receptor β 3-adrenérgico (B). Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-11$ animales por grupo experimental. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ 189

Figura 54. Niveles de proteína de la ruta de AMPK en el núcleo ventromedial (A), niveles de proteína de la ruta de AMPK en el hígado (B) y niveles de orexinas en el área lateral hipotalámica (C). Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-8$ animales por grupo experimental. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ 190

Figura 55. Imágenes térmicas representativas (panel izquierdo) y temperatura de la piel del área del BAT (A), niveles de UCP1 y receptor β 3-adrenérgico (B). Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-11$ animales por grupo experimental. La línea discontinua hace referencia a los valores del grupo control AAL que representa el 100%. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ 191

Figura 56. Niveles de proteína de la ruta de AMPK en el núcleo ventromedial (A), niveles de proteína de la ruta de AMPK en el hígado (B) y niveles de orexinas en el área lateral hipotalámica (C). Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-8$ animales por grupo experimental. La línea discontinua hace referencia a los valores del grupo control AAL que representa el 100%. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ 192

Figura 57. Imágenes térmicas representativas (panel izquierdo) y temperatura de la piel del área del BAT (A), niveles de UCP1 y receptor β 3-adrenérgico (B). Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-11$ animales por grupo experimental. *AC21 vs IN21: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. AC21 vs AAL: # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ y ### $p < 0.001$ 193

Figura 58. Niveles de proteína de la ruta de AMPK en el núcleo ventromedial (A), niveles de proteína de la ruta de AMPK en el hígado (B) y niveles de orexinas en el área lateral hipotalámica (C). Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-8$ animales por grupo experimental. *AC21 vs IN21: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. AC21 vs AAL: # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ y ### $p < 0.001$ 194

Figura 59. Imágenes térmicas representativas (panel izquierdo) y temperatura de la piel del área del BAT (A), niveles de UCP1 y receptor β 3-adrenérgico (B). Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-11$ animales por grupo experimental. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ 196

Figura 60. Niveles de proteína de la ruta de AMPK en el núcleo ventromedial (A), niveles de proteína de la ruta de AMPK en el hígado (B) y niveles de orexinas en el área lateral hipotalámica (C). Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-8$ animales por grupo experimental. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ 197



FINANCIACIÓN

Para llevar a cabo esta tesis doctoral, Ángela Fraga Varela ha sido beneficiaria de una ayuda predoctoral de la Xunta de Galicia (Plan I2C-2014).

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

La doctoranda Ángela Fraga Varela declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis doctoral.



AGRADECIMIENTOS

Ha llegado el día. Por fin me veo escribiendo estas líneas. Han pasado unos cuantos años desde que empecé mi aventura en la Ciencia, y por eso, espero no olvidarme de nadie.

En primer lugar, agradecer a mi director de tesis Emilio Gutiérrez por toda la dedicación y la confianza depositada desde el primer momento. Por sacar de mi lo que ni yo sabía que tenía y hacerme ver las cosas desde el optimismo y con pasión por cada descubrimiento. Gracias por enseñarme “a ver lo que todo el mundo ha visto y pensar en lo que nadie ha pensado”. A mi codirector, Miguel López, que me abrió las puertas de su laboratorio y me introdujo en un mundo nuevo para mí que terminó por fascinarme y del que he aprendido muchísimo. Gracias por darme la oportunidad de pertenecer a un grupo de excelencia científica.

En la Unidad Venres Clínico he tenido la suerte de compartir rutina con mi “casi-codirectora” Olaia Carrera, con la que siempre es un inmenso placer trabajar. Y con Reyes Vázquez, gracias por toda la compañía, ayuda, consejos y risas que me has regalado.

Me gustaría agradecer también al Dr. Marcos Couselo sin cuya aportación los estudios de leptina y SIH no habrían sido posible. Gracias también al Dr. Carlos Diéguez y al Dr. Rubén Nogueiras por toda la ayudada brindada.

Muchas gracias al Profesor Constantino Arce, que siempre con gran disposición, me ha ayudado con sus excepcionales lecciones de estadística que guardo como oro en paño. Gracias al Profesor Alfredo Campos, por su interés y ánimo cada vez que nos encontrábamos. Y a la Profesora Paula Villar por la confianza depositada en mi para impartir las prácticas de su asignatura y por el apoyo ofrecido en estos últimos años.

Durante estos ocho años he estado viviendo entre dos mares, la psicología y la biología, y en el camino me he encontrado con personas maravillosas que no solo me han ayudado muchísimo en mi devenir científico, sino que algunos se han convertido en parte importante de mi vida. Todos estos años no tendrían sentido sin la existencia de los Algodoncitos: Pablo, Luigi, Noelia y Marta. Ellos me han enseñado desde el primer momento a defenderme en el laboratorio, desde cómo utilizar una pipeta hasta las PCR. Pero no solo eso, sino que hicieron que el ir a trabajar fuera sumamente divertido. De Pablo me quedo con sus acertadas lecciones y las carcajadas que hacían doler la tripa. De Luigi las bromas y los engaños que me colaba, las clases de portugués (falso portugués) y sus obras de ingeniería dignas de la NASA. De Marta los intensos debates cuya temática podía variar desde lo más trascendental y serio hasta lo más absurdo. Y de Noe, toda la ayuda incondicional prestada siempre que lo he necesitado, los trenes del pis y del cepillado, los bailes y las conversaciones. Veros marchar poco a poco empequeñecía cada vez más al CIMUS.

Pero también fueron llegando otros compañeros al POL2 a los que seguramente decir gracias se quede corto. Patri, un ejemplo a seguir, trabajadora como ninguna y una valiente. Cris, el pegamento que nos unía a todos, siempre empujando hacia arriba a cada uno de nosotros. Ismael, siempre dispuesto a ayudar y aportar el cien por cien de sí mismo. Edward, un indispensable con mayúsculas, gracias por los momentos dentro y fuera del laboratorio. Y Eva, por todos y cada uno de los mil favores. Gracias también a Nathalia, Laura, Óscar, Ánxela, Valentina, Mayte, Diana, Gustavo, Tania y Ahmed.

No puedo olvidarme de los vecinos, los POL3 y POL4. Quisiera dar un especial gracias a Cintia por estar siempre dispuesta a resolver mis dudas con una sonrisa, aunque estuviese *a full* de trabajo, por ser mi nexo en estos últimos años en los que no podía estar tan presente en el CIMUS. A Bego, por su compañerismo y alegría. A Mónica, porque una conversación con ella hacía que el ánimo y la autoestima científica subiesen como la espuma. A Juan, por las charlas (muchas de gatos), las tonterías y lo que no lo eran tanto. A David, por sus reconfortantes abrazos. Gracias a Marcos, Chusa, Estrella, Dani, Amparo, Mar, Omar, Leonardo, Eva Tudurí, Sabela y Javi.

Gracias a “las de Clara”: Sihara, Mari, Alberto y Miguel (ay Chenlo, las fiestas...). Y sobre todo a Fer y a Ángela Ro. A Fer por sus locuras, sus elocuencias, por hacerme comer huevo frito y viciarme a los dorayakis, por ser amigo. Y Ángela, una de las mejores personas que he conocido en mi vida y de la que estoy muy orgullosa de poder llamar amiga. Gracias por aparecer.

Gracias a “Las Plaquetas”: María, Irene y Lidia. Porque los *breaks* con vosotras no tienen precio. Gracias Irene por estar siempre receptiva a resolver la infinidad de dudas burocráticas y legales a las que nos hemos enfrentado (y que aún están por venir). E infinitas gracias a María, otro de los grandes regalos que me llevo para toda la vida.

Al recibir la beca predoctoral mi ubicación de trabajo cambió de los Vernes Clínicos a un despacho bien “xeitoso”. Ahí fue cuando descubrí que la leyenda de que en la Facultad de Psicología existían más doctorandos era cierta. Mi primer contacto con esos seres extraños fue un valenciano recién llegado y “defisioso” por relaciones sociales que me puso en contacto con otros especímenes similares. Un tiempo después surgió lo que hoy somos, la RAE, y que considero una segunda familia: Pérez, Marina, Samuel, Carina y Marcos. Cada uno por separado y todos en conjunto han hecho que este viaje adquiriera una nueva perspectiva. Pérez y los continuos robos de merienda a cambio de chuches de perro que no quería y el ~~mal~~ Dr. Amor. Marina y sus continuas formas de tentar a Murphy, las cenas con vistas, el convertirme en menos ~~tox~~ tortuga. Samuel y su imparcialidad, siempre esperando sus palabras para poner calma y perspectiva (casi siempre). Marcos y su indecisión para elegir una sola de las Guerras Púnicas, el pincho de la rosa. Carina, que cuando aparece está todo completo. Gracias, chicos.

También me gustaría agradecer a Sara, por toda la sangre centrifugada, la ayuda con los western blot del hospital y su amabilidad perenne. Gracias a todas las personas responsables del Animalario de Biología que he ido conociendo: Mario, Chus, Javier, Marga y Yésica, que siempre están dispuestos a hacerte la vida más fácil.

No puedo dejar de agradecer a todas aquellas personas que siempre han pertenecido a mi círculo privado que de un modo u otro también han aportado su granito de arena. A mi ASTC: Saray y Andrea, que, aunque mayormente en la distancia siempre están muy presentes, soportando dramas, dudas y alegrías con audios infinitos. A la ONU: Zei, Nayba, Vane, Thaís, Ira y Elena. Porque cada reunión juntas es un soplo de aire fresco que renueva fuerzas. Y a Kiko, por aguantar mis largos *speechs*. Pero quien sin duda ha sufrido más esta tesis esa es Érika. Sin tener mucha idea de qué iba esto de las ratas (y a pesar de todo el asco que le dan) ponía toda su atención en lo que le contaba e intentaba comprenderlo. Y cuando aparecían las crisis, ahí estaba, para escuchar todo mi drama y animarme. Con las palabras precisas. Y dándome un tirón de orejas si era necesario. Al principio, en nuestros paseos terapéuticos camuflados en intenciones de “poner las cachas duras” y más adelante en la distancia. Sin olvidar las quedadas en cualquier parte del mundo que tanta vida me han dado y que recargaban pilas. Y al final, siendo la más ajena a este mundo has sido quien mejor ha comprendido todo. Gracias, Érika.

Y gracias a Andrea por la nueva vida.

Por último, y por ello los más importantes: mi familia. Gracias a mi madre, mi padre, mi hermana, Quelio, Rosario y mi abuelo. Por todo el apoyo incondicional, desde el moral hasta el logístico.